ZUR BESTIMMUNG VON KETOSTEROIDEN MIT 2,4-DINITROPHENYLHYDRAZIN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität des Saarlandes

vorgelegt von dem
"Diplomierten der Chemie"
László R. Treiber
aus Tiszaroff/Ungarn

Mainz 1968

ZUR BESTIMMUNG VON KETOSTEROIDEN MIT 2,4-DINITROPHENYLHYDRAZIN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität des Saarlandes

vorgelegt von dem
"Diplomierten der Chemie"
László R. Treiber
aus Tiszaroff/Ungarn

Mainz 1968

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Juni 1968

Der Dekan: Prof. Dr. H. Soehngen

Berichterstatter: Prof. Dr. G.W. Oertel

Prof. Dr. B. Eistert

Herstellung: R. Schwarzbold, 5301 Witterschlick b. Bonn

M E I N E N E L T E R N.

INHALTSVERZEICHNIS.

	Seite
I. EINLEITUNG	8
II. PROBLEMSTELLUNG	15
III. THEORETISCHER TEIL	17
1. Optimale Reaktionsbedingungen	17
2. Reinigung, Chromatographie	25
3. Photometrische Charakterisierung	32
4. Analyse verschiedener Steroide	35
A. Bestimmung von freiem Ätiocholanolon im Plasma	37
B. Bestimmung von freiem Progesteron im Plasma	37
C. Bestimmung von 17-Ketosteroiden im Plasma	39
D. Bestimmung von 17-Ketosteroiden im Urin	39
5. Radiochemische Versuche	42
6. Bestimmung von Oxysteroiden mittels der 2,4-Dinitrophenylhydrazin-reaktion nach entsprechender Oxydation	47
7. Photodensitometrie	49
8. Überprüfung der Spaltung von Steroidkonjugaten mittels der 2,4-Dinitrophenylhydrazin-reaktion	58
IV. VERSUCHE	70
1. Ausarbeitung der optimalen Reaktionsbedingungen für die 2,4-Dinitrophenylhydrazin-reaktion	70
A. Reaktionsgeschwindigkeit in Äthanol-Salzsäure	70

B. Bestimmung der erforderlichen Reagenzmenge für die Reaktion in Äthanol-Salzsäure 70

C. Auswahl eines geeigneten, in Benzol löslichen Katalysators 71

D. Bestimmung der erforderlichen Reagenzmenge für die Reaktion in Trichloressigsäure/Benzol 72

E. Bestimmung der erforderlichen Mindestmenge von Trichloressigsäure 72

F. Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit bei verschiedenen Temperaturen 73

G. Eichkurve für die Bestimmung von Androsteron 74

H. Wiederauffindungsversuche 74

J. Störungen bei der 2,4-Dinitrophenylhydrazin-reaktion 75

K. Reinigung von Steroid-2,4-dinitrophenylhydrazonen 76

L. Vorschrift zur Ausführung der Bestimmung von Ketosteroiden mittels der 2,4-Dinitrophenylhydrazin-reaktion 77

2. Chromatographische Trennung von Steroid-2,4-dinitrophenylhydrazonen 78

3. Bestimmung der molaren Extinktionskoeffizienten von 2,4-Dinitrophenylhydrazonen 79

4. Anwendung der 2,4-Dinitrophenylhydrazinreaktion bei Steroidbestimmungen in Körperflüssigkeiten 80

A. Vorschrift zur Bestimmung von freien Steroiden im Plasma 80

B. Vorschrift zur Bestimmung von Dehydroepiandrosteron, Androsteron und Ätiocholanolon im Plasma 81

C. Vorschrift zur Bestimmung von 17-Ketosteroiden im Harn 83

5. Versuche zur Bestimmung von Ketosteroiden mit markiertem 2,4-Dinitrophenylhydrazin 84

A. Herstellung des Derivates durch Austausch 84

B. Reaktion von Testosteron mit 1,3,5-^{3}H-2,4-Dinitrophenylhydrazin 85

C. Chromatographische Reinigung von Testosteron-2,4-dinitrophenylhydrazon 85

6. Bestimmung von alkoholischen Steroiden mittels der 2,4-Dinitrophenylhydrazinreaktion 86

A. Versuche zur Oxydation alkoholischer Steroide 86

B. Vorschrift zur Bestimmung von Oxysteroiden (alkoholischen Steroiden) 88

7. Densitometrische Auswertung der Chromatogramme 89

A. Vorversuche mit dem Schwärzungsmesser der Dr. Bruno Lange G.m.b.H., Berlin 89

B. Untersuchungen mit dem Zweibandspektrodensitometer SD-3000 der Schoeffel-Instrument-Co 90

C. Photodensitometrische Auswertung bei 17-Ketosteroidbestimmungen im Urin 91

D. Photodensitometrische Auswertung bei 17-Ketosteroidbestimmungen im Plasma 91

8. Überprüfung der Spaltung von Steroid-konjugaten aus biologischen Extrakten anhand der 2,4-Dinitrophenylhydrazin-reaktion 97

A. Zeitlicher Verlauf der Solvolyse in Äthylacetat-Perchlorsäure 97

B. Extraktion von Steroidkonjugaten aus wässriger Lösung 98

C. Spaltung von Steroidkonjugaten in ätherischer Perchlorsäure 99

D. Geschwindigkeit der Solvolyse in Äther-Perchlorsäure 100

E. Vergleich der 2,4-Dinitrophenylhydrazin-reaktion mit herkömmlichen Methoden 100

V. ZUSAMMENFASSUNG 102

VI. LITERATURVERZEICHNIS 103

VII. TRIVIALNAMEN UND NOMENKLATUR 106

VIII. HERKUNFT DER PRÄPARATE UND HILFSMITTEL 108

DANKSAGUNG 109

LEBENSLAUF 110

I. EINLEITUNG.

In der Praxis des Endokrinologen - sei er Chemiker, Biochemiker oder Mediziner - spielen die chemischen Bestimmungsmethoden eine entscheidende Rolle. Da bereits geringste Hormonmengen eine hohe physiologische Aktivität besitzen können, wobei die Unterschiede zwischen normalen und pathologischen Fällen in absolutem Sinne ebenfalls sehr niedrig ausfallen, sind die Anforderungen an Bestimmungsmethoden sehr groß. Es gilt dies besonders für solche Untersuchungen, bei denen biologisches Material nur in beschränkten Mengen zur Verfügung steht (Blutplasma, Gewebe u.s.w.).
Im allgemeinen verlangt man von einem brauchbaren analytischen Verfahren die Erfüllung folgender Kriterien:
1. Empfindlichkeit: Unter Empfindlichkeit versteht man die niedrigste Konzentration der analysierten Verbindung, die sich statistisch signifikant vom Leerwert unterscheiden läßt. Von ihr hängt die Menge biologischen Materials ab, die für eine Analyse benötigt wird. Es ist verständlich, daß die Reinigung um so größere Schwierigkeiten bereitet, je größer das aufzuarbeitende Ausgangsmaterial ist.
2. Richtigkeit: Die Richtigkeit einer Analysenmethode bezeichnet den Anteil der zu analysierenden Verbindung, der bei der Bestimmung tatsächlich erfasst wird. Ihre Prüfung erfolgt durch Wiederauffindungsversuche, ihre Angabe in Prozent. Daß man auftretende Verluste durch Isotopenverdünnung erfassen kann - wodurch die Ergebnisse rechnerisch zu korrigieren sind -, sei nur am Rande vermerkt.

Analysen mit einer Richtigkeit unter 70-75% bedürfen zumeist einer derartigen Korrektur.

3. Genauigkeit: Als Genauigkeit bezeichnet man die Abweichung der Einzelwerte vom Mittel im Verlauf von Mehrfachanalysen. Die Schwankungen der Einzelbestimmungen sollten so klein wie möglich sein, sodaß sich z.B. physiologische und pathologische Konzentrationen deutlich voneinander abheben.

4. Spezifität: Jede Analysenmethode erfordert den Nachweis, daß es sich bei der erfassten Verbindung, bzw. der Verbindungsgruppe wirklich um die angegebene Substanz, bzw. Substanzgruppe handelt. Physikochemische Eigenschaften isolierten Materials bei UV- und IR-Spektrophotometrie, bei Massenspektrometrie und Circular-Dichrographie, bei Chromatographie oder Elektrophorese bieten ebenso die Möglichkeit einer eindeutigen Identifizierung wie seine Umwandlung in charakteristische Derivate oder leicht erkennbare Chromogene bei typischen Farbreaktionen.

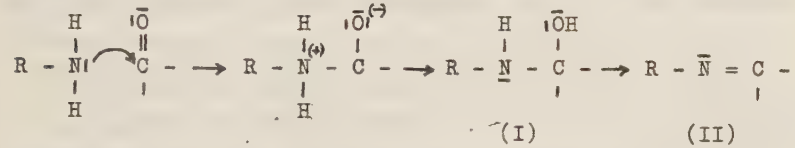
5. Brauchbarkeit: Selbst wenn alle vorausgegangenen Kriterien den Anforderungen entsprechen, so hängt die Einführung einer Bestimmungsmethode doch in einem gewissen Umfang davon ab, wie schnell und mit welchem Aufwand die Einzelanalyse vom Untersucher durchgeführt werden kann. Gaschromatographie mit Elektroneneinfangdetektoren oder Einsatz teurer Isotopen markierter Reagenzien bleiben verständlicherweise auf einige wenige Laboratorien beschränkt. Sind die obigen Zuverlässigkeitskriterien zufriedenstellend erfüllt, so steht einer Anwendung der Methode in der routinmäßigen, wie auch der wissenschaftlichen Arbeit nichts mehr im Wege.

Obgleich sich die Zimmermann-reaktion (1, 2) als Nachweis von 17-Ketosteroiden in qualitativen und quantitativen Untersuchungen hinlänglich bewährt hat, so fehlt ihr doch die Empfindlichkeit, wie sie z.B. zur Bestimmung vorgenannter C_{19}-steroide in geringen Plasmavolumina erforderlich ist. Da auch andere in Körperflüssigkeiten vorkommende Substanzen mit dem Zimmermann-reagenz Chromogene bilden (3, 4), bedingen zuverlässige Messungen eine sorgfältige Reinigung. Zur Bestimmung der Einzelkomponenten muß man das Steroidgemisch einer mühsamen und langwierigen Chromatographie unterziehen (5, 6, 7). Ferner gilt es zu bedenken, daß das Zimmermann-chromogen in jedem Falle eine instabile Verbindung darstellt und eine Charakterisierung der beteiligten und zu analysierenden Verbindungen nach der Messung nicht mehr möglich ist.

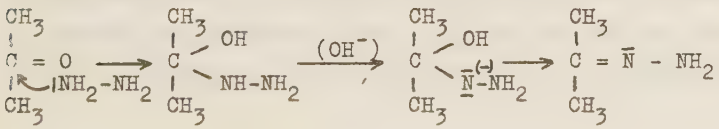
Es lag infolgedessen nahe, anstelle der zwar als spezifisch anerkannten Zimmermann-reaktion die weitaus empfindlichere Umsetzung von Ketosteroiden mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin zur quantitativen Erfassung derartiger Verbindungen heranzuziehen, zumal die Beständigkeit der gebildeten Derivate im Verein mit ihrer intensiven Farbe sowohl jegliche Handhabung, wie auch eine etwaige chromatographische Isolierung erleichtern sollte.

Die präparative Herstellung von 2,4-Dinitrophenylhydrazonen ist in der organischen Chemie hinlänglich bekannt (8, 9, 10, 11, 12 u.a.). Sie hat sich besonders bei der Charakterisierung von Oxoverbindungen bewährt.

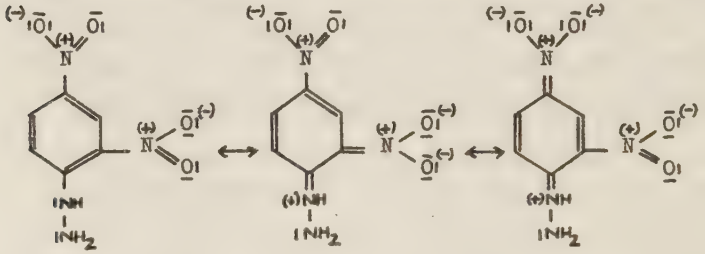
Theoretisch betrachtet, verläuft die Reaktion nach dem Mechanismus der Addition von Aminderivaten (NH_3, R-NH_2, R-CO-NH-NH_2, Ar-NH-NH_2 u.s.w.) an die C=O-bindung. Der Angriff der nucleophilen -NH_2-gruppe auf das C-atom der C=O-gruppe eröffnet die Reaktionsfolge, wobei zunächst die Anlagerungsverbindung (I) entsteht,



die dann durch eine säurekatalysierte Wasserabspaltung in das Endprodukt (II) übergeht. Der letzte Schritt aber bestimmt hier die Reaktionsgeschwindigkeit. Bei erhöhter Acidität wird die Wasserabspaltung zum Teil beschleunigt, die Bildung der Anlagerungsverbindung (I) dagegen verlangsamt, da die entstandene "konjugierte Säure" (-NH_2 -NH_3^+) reaktionsträge ist (54). Es wird der nucleophile Angriff der -NH_2-gruppe zum reaktionsbestimmenden Vorgang. Aus den Reaktionsbedingungen zur Bildung verschiedener Hydrazone geht solches deutlich hervor. Diejenigen Reagenzien, die besonders leicht -NH_3^+ konjugierte Säure bilden, reagieren nämlich in Gegenwart starker Säure praktisch überhaupt nicht. Man beobachtet stattdessen eine basenkatalysierte Wasserabspaltung, wie z.B. bei Reaktion von Aceton mit Hydrazin (13), wo die Bildung des Aceton-hydrazons in Gegenwart von BaO etwa nach folgendem Schema vor sich geht:



In Übereinstimmung mit vorgenannter Theorie reagiert Phenylhydrazin - entsprechend seiner dem Hydrazin gegenüber geringeren Basizität - in Gegenwart von Essigsäure, wärend Mineralsäuren eine Reaktion weitgehend verhindern (14, 15, 16). Es entspricht diese Umsetzung der Semicarbazonbildung, wo starke Säuren ebenfalls mit Natriumacetat abgepuffert werden müssen (17). Bei ausgesprochenen schwachen Basen, wie 2,4-Dinitrophenylhydrazin, ist die Gegenwart einer ausreichend starken Säure sogar die Voraussetzung zum Ablauf der Kondensation (8, 9, 10, 11, 12, 18). Die Nitrogruppen bewirken eine starke Elektronenverdünnung im Benzolring, die sich auch auf die Hydrazingruppe erstreckt:



Die Protonenaffinität der Stickstoffatome in der Hydrazingruppe ist dabei stark herabgesetzt, sodaß die Bildung der konjugierten Säure $-NH_3^+$ erst bei einer hohen H^+-Konzentration zustandekommt. Die Lage der Oxogruppe innerhalb des Moleküls spielt bei der Reaktionsgeschwindigkeit eine große Rolle. So reagieren α-Oxyketone vom Acyloin- und Benzointyp nur langsam (19). Im allgemeinen wirken bei den Carbonylverbindungen die -OH-gruppen in α-Stellung verzögernd, α-Halogen-, α-Methoxy-, α-Alkyl- und -Arylgruppen, sowie α,β-C=C-bindungen dagegen beschleunigend auf die Reaktion (20).

Verständlicherweise ist die Reaktion auch umkehrbar:

$$>C = O + H_2N - NH_2 - R \rightleftharpoons >C = N - NH - R + H_2O$$

Durch ständigen Entzug der Hydrolysenprodukte, wie etwa durch Abdestillieren der Oxoverbindung oder Bindung des freigewordenen Hydrazin-derivats (21, 22) gelingt es, die rückläufige Spaltung zu vervollständigen.

Die Ausarbeitung geeigneter Bedingungen für die Bestimmung von Ketosteroiden mittels der 2,4-Dinitrophenylhydrazinreaktion versuchten REICH und Mitarb. bereits vor 15 Jahren (23, 24). Die gebildeten Derivate stellten wohldefinierte, leicht kristallisierbare und intensiv gefärbte Verbindungen dar, die aufgrund ihrer Stabilität eine ausgiebige Reinigung und zuverlässige Schmelzpunktbestimmung erlaubten. Seither bemühten sich verschiedene Arbeitsgruppen (21, 25, 26, 27, 28, 29) um brauchbare Vorschriften zur Bestimmung von Ketosteroiden mittels der 2,4-Dinitrophenylhydrazin-methode. Die Durchführung der Reaktion geschah im Wesentlichen analog zu den aus der präparativen organischen Chemie bekannten Verfahren. Da die Oxoverbindungen in sehr geringen Konzentrationen vorlagen, wurde das Reagenz in großem Überschuß angewandt. Aus diesem Grund war auch kein Niederschlag von Reaktionsprodukten zu erwarten. Zwecks Photometrie mußte man vor allem das ebenfalls intensiv gefärbte Reagenz entfernen. Erfahrungsgemäß führen aber die bislang beschriebenen Reinigungsmethoden nicht zum gewünschten Ziele. Spaltet doch eine Behandlung des Reaktionsgemisches mit $KMnO_4$ in Na_2CO_3-

lösung (26) oder mit Brenztraubensäure teilweise auch das bereits entstandene Ketosteroid-2,4-dinitrophenylhydrazon. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß nicht einmal die jüngste diesbezügliche Arbeit von STARNES und Mitarb. (29) Unterschiede in der spezifischen Extinktion von 2,4-Dinitrophenylhydrazonen α,β-ungesättigter und gesättigter Oxosteroide angibt. Diese Tatsache läßt darauf schließen, daß die quantitative Erfassung der Ketosteroide nicht mit notwendiger Genauigkeit geschah, obgleich die Unterschiede der molaren Extinktionskoeffizienten bei obigen Verbindungsgruppen rund 30-proz. betragen. Solche Erfahrungen dürften auch den Grund dafür darstellen, daß sich die Zimmermannreaktion der weitaus empfindlicheren 2,4-Dinitrophenylhydrazon-bildung gegenüber solange behaupten konnte.

II. PROBLEMSTELLUNG.

Nachdem die bisher in der Fachlieteratur beschriebenen Verfahren zur Bestimmung von Ketosteroiden mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin keineswegs befriedigten und als Ersatz für die unempfindliche Zimmermann-reaktion nicht in Frage kamen, erschien die Entwicklung eines modifizierten Analysenverfahrens mit zufriedenstellenden Zuverlässigkeitskriterien notwendig. In Anbetracht der niedrigen Konzentrationen von Steroiden in biologischem Material ließen sich die aus der präparativen organischen Chemie bekannten Vorschriften zur Herstellung von 2,4-Dinitrophenylhydrazonen nicht ohne weiteres auf die Bildung derartiger Steroid-derivate übertragen. Aus diesem Grunde war das Ziel der vorliegenden Arbeit:

1. Die Ermittlung optimaler Reaktionsbedingungen für die Umsetzung von Ketosteroiden mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin.
2. Die Reinigung der Derivate durch Chromatographie.
3. Die photometrische Charakterisierung der Derivate zwecks Sicherung einer ausreichenden Spezifität.
4. Die Anwendung der 2,4-Dinitrophenylhydrazin-reaktion für die Bestimmung von Ketosteroiden in biologischen Extrakten:
   - A. Bestimmung von freiem Ätiocholanolon im Plasma.
   - B. Bestimmung von freiem Progesteron im Plasma.
   - C. Bestimmung von 17-Ketosteroiden im Plasma.
   - D. Bestimmung von 17-Ketosteroiden im Harn.
5. Versuche zur Anwendung von radioaktiv-markiertem Reagenz.

6. Anwendung der 2,4-Dinitrophenylhydrazin-reaktion zur Bestimmung von Oxysteroiden (alkoholischen Steroiden).

7. Versuche zur vereinfachten Auswertung der 2,4-Dinitrophenylhydrazin-reaktion mittels Densitometrie.

8. Anwendung der 2,4-Dinitrophenylhydrazin-reaktion zur Überprüfung der Spaltung von Steroid-konjugaten aus biologischen Extrakten.

III. THEORETISCHER TEIL.

1. Optimale Reaktionsbedingungen.

Aufbauend auf den in der Einleitung genannten Arbeiten versuchte man, zunächst die optimalen Reaktionsbedingungen für die Bildung der 2,4-Dinitrophenylhydrazon-derivate von Steroiden festzulegen und wenn möglich, den ganzen Arbeitsvorgang zu vereinfachen. Unter den klassischen Bedingungen verlief die Reaktion bei einem 30fachen Reagenzüberschuß, einer Reaktionszeit von 75 Minuten und einer Reaktionstemperatur von 70° C praktisch quantitativ (Abb.1.). Die Entfernung solcher Mengen an überschüssigem Reagenz stellt bei Analysen ein großes Problem dar. Die chromatographische Reinigung ließ sich im Verlauf derartiger Analysen nur anwenden, wenn das gebildete Steroid-2,4-dinitrophenylhydrazon unpolarer war als das Reagenz. Bei polaren Derivaten verschmiert das Reagenz über eine lange Strecke des Dünnschichtchromatogramms und macht zumindest ein zweite Chromatographie notwendig. Diese Gefahr besteht vor allem bei der Analyse von größeren Steroidkonzentrationen. Es ist allerdings bemerkenswert, daß die Verluste bei mehrmaliger Chromatographie immer noch geringer sind, als die bei Reinigung mit $KMnO_4$ oder Brenztraubensäure auftretenden, die zudem auch noch eine chromatographische Abtrennung der Derivate erfordern. Da es sich den Ausführungen der Einleitung zufolge bei der 2,4-Dinitrophenylhydrazin-reaktion offensichtlich um eine Gleichgewichtsreaktion handelt, wurde über die Rolle der Temperatur und des Reagenzüberschusses hinaus auch der Einfluß des Lösungsmittels und des Katalysators geprüft.

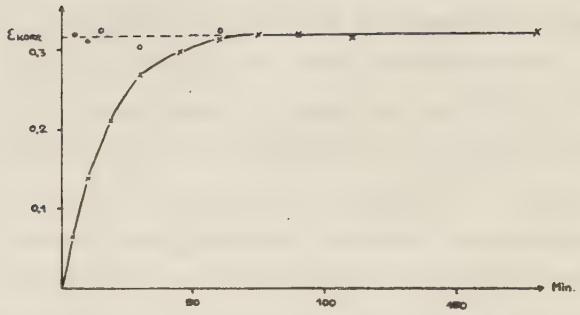


Abb.1.

Bildung von Androsteron-2,4-dinitrophenylhydrazon
a) in Äthanol-konz. Salzsäure (98:2 V/V) / x——x /
b) in 0,01-proz. Trichloressigsäure in Benzol / o----o /
0,2 mg 2,4-Dinitrophenylhydrazin
1,0 ml Lösungsmittel

Die Verschiebung des Gleichgewichtes zugunsten des gewünschten Derivates kann verständlicherweise dadurch erfolgen, daß man eines der Reaktionsprodukte ständig aus dem Reaktionsgemisch entfernt. Es muß das Lösungsmittel dabei über die Eigenschaft verfügen, die Reaktionskomponenten stets in ausreichendem Maße zu lösen. Benzol schien diese Voraussetzung zu erfüllen, da es gebildetes Wasser kaum löst und durch die Bildung eines azeotrop-destillierenden Gemisches für dessen Entfernung sorgen kann. Es war daher anzunehmen, daß die Bildung von 2,4-Dinitrophenylhydrazon in Benzol bei Anwesenheit eines geeigneten Katalysators mit quantitativer Ausbeute vonstatten geht. Bei der Auswahl des Katalysators galt es zu beachten, daß dieser bei guter Löslichkeit in Benzol eine ausreichende katalytische Wirkung besitzen mußte, ohne empfindliche Ketosteroide gleichzeitig chemisch zu verändern. Hier kamen vor allem Säuren, wie p-Toluolsulfonsäure, Aluminiumchlorid, Trichloressigsäure u.a. in Frage. Die ersten beiden Verbindungen sind als Kondensationsmittel für viele in Benzol ablaufenden Reaktionen längst bekannt. Trichloressigsäure stellt eine starke Säure dar, ohne jedoch die Nebenwirkungen der beiden anderen vorangehenden Verbindugen zu besitzen. Wie aus den entsprechenden Experimenten hervorging, erhielt man unter gleichen Reaktionsbedingungen mit Trichloressigsäure die beste Ausbeute (Tab.1.). Die korrigierte Absorption von 0,328 - berechnet nach der üblichen Formel (38):

$$Abs._{370\ korr} = 2 \times Abs._{370} - Abs._{335} - Abs._{405}$$

entsprach einer quantitativen Ausbeute (bei authentischem Material 0,317), während die Reaktion mit p-Toluolsulfonsäure eine korrigierte Absorption von nur 0,140 ergab. Mit Aluminiumchlorid ließ sich keine Reaktion nachweisen. Hinsichtlich ihrer Wirkung untersuchte man ferner Benzoesäure, Eisessig und Bortrifluorid. Die Auswertung der Experimente geschah nur visuell und daher semiquantitativ. Es war jedoch eindeutig festzustellen, daß unter denselben Bedingungen Trichloressigsäure sich als Katalysator für die 2,4-Dinitrophenylhydrazin-reaktion besser eignet als alle anderen hier erwähnten Substanzen. Auf die Erforschung des Wirkungsmechanismus einzelner Katalysatoren wurde verzichtet.

Nachdem sich Trichloressigsäure als geeigneter Katalysator erwies, konnten die optimalen Reaktionsbedingungen ausgearbeitet und zum Vergleich den herkömmlichen Verfahren gegenübergestellt werden. Die diesbezüglichen Untersuchungsergebnisse sind deshalb gemeinsam in den Tabellen 1, 2, 3 und den Abbildungen 1 und 2 aufgeführt. Die für eine quantitative Umwandlung von Ketosteroiden in die entsprechenden 2,4-Dinitrophenylhydrazone erarbeiteten Reaktionsbedingungen sind dabei wesentlich günstiger als diejenigen der herkömmlichen Verfahren. Ein 7facher Reagenzüberschuß, eine Katalysatorkonzentration von 50 µg/ml und eine Reaktionszeit von 5 Minuten bei Zimmertemperatur gewährleisten eine quantitative Ausbeute. Sicherheitshalber wurde für die praktische Anwendung eine Katalysatorkonzentration von 300 µg/ml und eine 15minütige Reaktionszeit bei 40° C gewählt. Dadurch

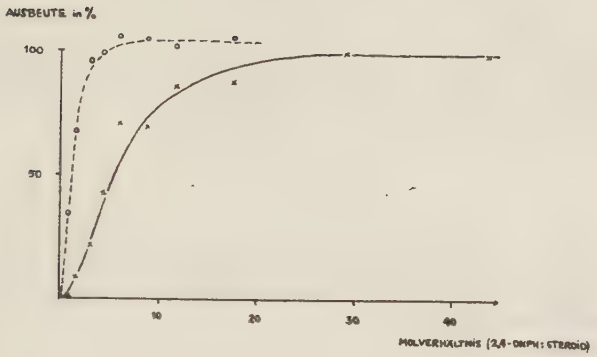


Abb.2.

Bestimmung der erforderlichen Reagenzmenge in:
a) Äthanol-konz. Salzsäure (98:2 V/V) / x——x /
b) 0,1-proz. Trichloressigsäure in abs. Benzol / o----o /.

Tab.1.

Einfluß verschiedener Katalysatoren auf die Bildung von Androsteron-2,4-dinitrophenylhydrazon.

Katalysator	$Abs._{korr.}$
p-Toluolsulfonsäure	0,140
Aluminiumchlorid	-
Trichloressigsäure	0,328

Tab.2.

Bildung von Androsteron-2,4-dinitrophenylhydrazon bei
a) 0,02-proz. 2,4-Dinitrophenylhydrazin in Äthanol-konz. Salzsäure (98:2 V/V).
b) 0,02-proz. 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 0,01-proz. benzolischer Trichloressigsäurelösung.

Zeit (Minuten)	Korrigierte Absorption (in 3,0 ml)					
	a)	b)				
	70°C	70°C	60°C	50°C	40°C	25°C
5	0,063	-	-	-	-	0,320
10	0,135	-	-	-	-	0,313
15	-	0,313	0,317	0,330	0,311	0,325
20	0,208	-	-	-	-	-
30	0,266	0,318	0,330	0,326	0,333	0,303
45	0,297	0,303	-	-	-	-
60	0,312	0,313	0,322	0,311	0,329	0,323
75	0,320	0,321	-	-	-	-
90	0,316	0,306	-	-	-	-
120	0,311	0,323	-	-	-	-
180	0,319	-	-	-	-	-

Tab.3.

Bestimmung der erforderlichen Reagenzmenge für die Umsetzung von 10,0 µg Androsteron in
a) Äthanol-konz. Salzsäure (98:2 V/V) und
b) 0,1-proz. Trichloressigsäure in Benzol.

Reagenzmenge (µg)	Molverhältnis (2,4-DNPH zu Steroid)	Korrigierte Absorption (in 3,0 ml)		Ausbeute (%)	
		a)	b)	a)	b)
5	0,73	0,000	0,110	0,00	34,70
10	1,46	0,028	0,214	8,83	67,50
20	2,91	0,068	0,304	21,45	96,00
30	4,36	0,134	0,314	42,25	99,10
40	5,82	0,224	0,336	70,60	106,10
50	7,27	0,234	0,332	73,80	104,80
60	8,73	0,220	0,322	69,40	102,20
80	11,63	0,272	0,334	85,80	105,40
120	17,45	0,278	-	87,70	-
200	29,10	0,316	-	99,70	-
300	43,60	0,314	-	99,10	-

Tab.4.

Bestimmung der erforderlichen Mindestmenge von Trichloressigsäure.

Reaktionsbedingungen: 40 µg 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 1 ml Benzol, 2 Stunden bei 40° C.

Trichloressigsäure-konzentration (µg/ml)	Korrigierte Absorption (in 3,0 ml)	Ausbeute (%)
1	0,000	0,00
10	0,324	103,50
30	0,310	97,80
50	0,328	106,60
100	0,324	102,00
200	0,326	102,90
500	0,325	102,50
1000	0,322	101,80

erhöht man die Löslichkeit der Reaktionskomponenten und vermeidet eventuelle, durch Basen verursachte Störungen. Den quantitativen Ablauf der 2,4-Dinitrophenylhydrazinreaktion bestätigten Kontrollversuche. Die Eichkurve mit Androsteron als Modellsubstanz ergab eine Gerade (Abb.3.) innerhalb des wichtigsten Konzentrationsbereiches von 0,50-30,0 µg. Dieser Befund bestätigt gleichzeitig die Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes. Wiederauffindungsversuche mit 2,0 µg radioaktivem Dehydroepiandrosteron und 1,0 µg Androsteron erbrachten eine Richtigkeit von 97% bzw. 96%, wobei die Genauigkeit der Einzelbestimmungen ±4% bzw. ± 6% betrug (Tab.5.).

2. Reinigung, Chromatographie.

Für die Spezifität der Bestimmungsmethode sorgte die Dünnschichtchromatographie des Reaktionsgemisches, die gleichzeitig der Reinigung und Abtrennung des Derivates dient. Verschiedene Kombinationen von Papier- und Dünnschichtchromatographie freier Ketosteroide, sowie eine gegebenenfalls mehrfache Dünnschichtchromatographie von 2,4-Dinitrophenylhydrazonen ermöglichen die einwandfreie Isolierung der Einzelverbindungen (Tab.6., Abb.4.). Die Beobachtung selbst kleinster Mengen von Steroid-2,4-dinitrophenylhydrazonen (bis zu 1 $\mu g/cm^2$) bietet den unübertroffenen Vorteil einer ständigen Kontrolle der Chromatographie und gestattet zudem eine visuelle Auswertung. Die Stabilität der Derivate erlaubt überdies eine wiederholte Chromatographie ohne größere Einbußen.

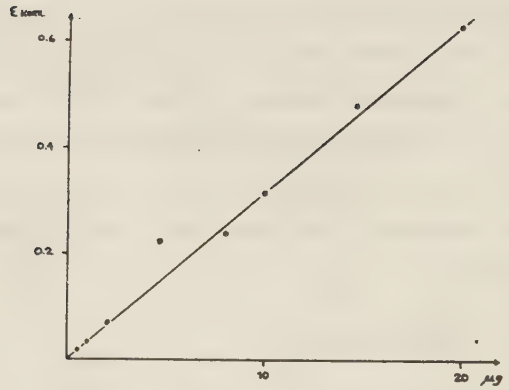


Abb.3.

Eichkurve für Androsteron ($\varepsilon_{korr.}$/µg/3,0 ml).

Tab.5.

Wiederauffindungsversuche mit 2,0 µg 7α-^{3}H-Dehydroepiandrosteron und 1,0 µg Androsteron.

7α-^{3}H-Dehydroepiandrosteron (2,0 µg = 12600 dpm)	Androsteron (1,0 µg)
11720	0,92
12470	0,99
11470	0,97
12610	0,86
12220	1,01
11850	0,99
12870	0,98
11840	0,90
12330	0,91
12710	1,03
M: 12220 = 97%	0,96
S: 460 = 4%	0,06

M: Mittel

S: Standardabweichung

Tab.6.

Wanderungsgeschwindigkeit von Steroid-2,4-dinitrophenylhydrazonen ("2,4-DNPH").

Steroid-derivat	System					
	A	B	C	D	E	F
Dehydroepiandrosteron-2,4-DNPH	0,16	0,29	0,48	0,50	0,51	0,69
Androsteron-2,4-DNPH	0,18	0,41	0,58	0,61	0,62	0,76
Ätiocholanolon-2,4-DNPH	0,14	0,33	0,52	0,56	0,59	0,72
Androstendion-bis-2,4-DNPH	0,50	0,67	0,83	0,87	0,90	0,96
Testosteron-2,4-DNPH	0,13	0,35	0,52	0,58	0,59	0,71
11ß-Hydroxy-androsteron-2,4-DNPH	0,0054	0,16	0,35	0,38	0,45	0,60
11ß-Hydroxy-ätiocholanolon-2,4-DNPH	0,0048	0,13	0,30	0,38	0,40	0,56
11-Keto-androsteron-17-(2,4-DNPH)	0,0057	0,20	0,41	0,46	0,49	0,65
Androstandion-bis-2,4-DNPH	0,50	0,70	0,82	0,84	0,92	0,97
Ätiocholandion-bis-2,4-DNPH	0,50	0,71	0,83	0,84	0,92	0,97
11-Keto-androstendion-3,17-bis-(2,4-DNPH)	0,31	0,60	0,75	0,76	0,83	0,97
11ß-Hydroxy-androstendion-bis-2,4-DNPH	0,14	0,53	0,64	0,69	0,75	0,91
Ätiocholantrion-3,17-bis-(2,4-DNPH)	0,29	0,62	0,74	0,78	0,82	0,96
Δ^5-Androsten-3ß,17ß-diol-16-on-2,4-DNPH	-	-	-	0,33	-	-
Pregnenolon-2,4-DNPH	0,13	0,36	0,45	0,52	0,52	0,65
Progesteron-bis-2,4-DNPH	0,57	0,78	0,86	0,87	0,99	-
17-Hydroxy-pregnenolon-2,4-DNPH	0,0039	0,16	0,27	0,43	0,45	-
17-Hydroxy-progesteron-bis-2,4-DNPH	0,21	0,55	0,66	-	0,78	-
Corticosteron-bis-2,4-DNPH*	-	0,20	0,33	-	-	-
Cortisol-bis-2,4-DNPH*	-	-	-	-	-	-
Cortison-bis-2,4-DNPH*	-	-	0,12	-	-	-
Desoxycorticosteron-bis-2,4-DNPH*	0,16	0,47	0,60	0,62	0,68	-
Pregnen-3ß,21-diol-20-on-2,4-DNPH	-	0,12	0,21	-	-	-
2,4-Dinitrophenylhydrazin	0,17	0,27	0,35	0,38	0,37	0,48

Fortsetzung der Tab.6.

Steroid-derivat	System						
	G	H	I	J	K	L	M
Dehydroepiandrosteron-2,4-DNPH	0,59	0,45	0,13	0,20	0,29	0,37	0,37
Androsteron-2,4-DNPH	0,68	0,54	0,18	0,25	0,36	0,45	0,44
Ätiocholanolon-2,4-DNPH	0,64	0,50	0,12	0,17	0,28	0,36	0,37
Androstendion-bis-2,4-DNPH	0,87	0,75	0,45	0,54	-	-	-
Testosteron-2,4-DNPH	0,65	0,51	0,15	0,22	0,33	0,41	0,41
11ß-Hydroxy-androsteron-2,4-DNPH	0,55	0,43	-	-	-	-	-
11ß-Hydroxy-ätiocholanolon-2,4-DNPH	0,52	0,40	-	-	-	-	-
11-Keto-androsteron-2,4-DNPH	0,63	0,44	-	-	-	-	-
11-Keto-ätiocholanolon-2,4-DNPH	0,61	0,41	-	-	-	-	-
Androstandion-bis-2,4-DNPH	0,87	0,74	0,45	0,54	-	-	-
Ätiocholandion-bis-2,4-DNPH	0,85	0,73	-	-	-	-	-
11-Keto-androstendion-3,17-bis-(2,4-DNPH)	0,86	0,70	-	-	-	-	-
11ß-Hydroxy-androstendion-bis-2,4-DNPH	0,79	0,66	-	-	-	-	-
Pregnenolon	0,61	0,46	-	-	-	-	-
Progesteron-bis-2,4-DNPH	0,85	0,75	0,48	0,58	-	-	-
17-Hydroxy-pregnenolon-2,4-DNPH	0,53	0,36	-	-	-	-	-
17-Hydroxy-progesteron-bis-2,4-DNPH	0,77	0,65	-	-	-	-	-
Corticosteron-bis-2,4-DNPH*	0,64	0,35	-	-	-	-	-
Cortisol-bis-2,4-DNPH*	0,34	0,13	-	-	-	-	-
Cortison-bis-2,4-DNPH*	0,63	0,16	-	-	-	-	-
Desoxycorticosteron-bis-2,4-DNPH*	0,64	0,49	-	-	-	-	-
5ß-Dihydrocortisol-bis-2,4-DNPH*	0,58	0,14	-	-	-	-	-
Tetrahydrocortisol-2,4-DNPH	0,12	0,05	-	-	-	-	-
Pregnen-3ß,21-diol-20-on-2,4-DNPH	0,60	0,35	-	-	-	-	-
2,4-Dinitrophenylhydrazin	0,35	0,27	-	-	-	-	-

Fortsetzung der Tab.6.

Chromatographische Systeme (aktiviertes Kieselgel G; Schichtdicke: 0,3 mm):

A. Chloroform
B. 1,96% Dioxan in Chloroform
C. 3,85% Dioxan in Chloroform
D. 6,00% Dioxan in Chloroform
E. 7,50% Dioxan in Chloroform
F. 10,0% Dioxan in Chloroform
G. Chloroform-Äthanol (19:1 V/V)
H. Benzol-Dioxan (4:1 V/V)
I. Tetrachlorkohlenstoff-Dioxan (10:1 V/V)
J. Tetrachlorkohlenstoff-Dioxan (10:1,5 V/V)
K. Tetrachlorkohlenstoff-Dioxan (5:1 V/V)
L. Tetrachlorkohlenstoff-Dioxan (4:1 V/V)
M. Tetrachlorkohlenstoff-Dioxan (10:3 V/V).

Die mit *gekennzeichneten Verbindungen ergaben mehrere Fraktionen, wobei die Hauptkomponenten berücksichtigt wurden.

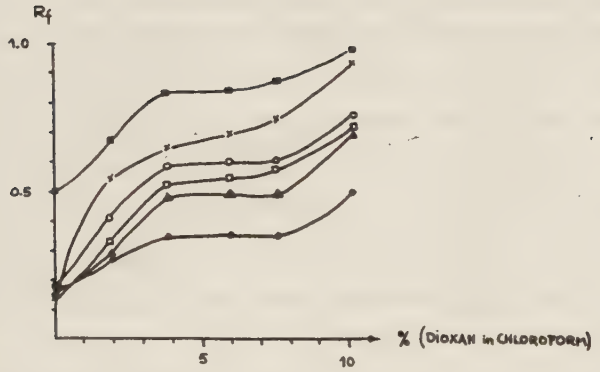


Abb.4.

Chromatographische Trennung von Ketosteroid-2,4-dinitrophenylhydrazone.

▲——▲: Dehydroepiandrosteron-2,4-dinitrophenylhydrazon
o——o: Androsteron-2,4-dinitrophenylhydrazon
□——□: Ätiocholanolon-2,4-dinitrophenylhydrazon
■——■: Androstendion-bis-2,4-dinitrophenylhydrazon
●——●: 2,4-Dinitrophenylhydrazin
x——x: 11ß-Hydroxy-androstendion-bis-2,4-dinitrophenylhydrazon.

3. Photometrische Charakterisierung.

Zwecks Aufklärung der photometrischen Eigenschaften wurden 2,4-Dinitrophenylhydrazone zahlreicher Ketosteroide und anderer Verbindungen unterschiedlicher Konstitution präparativ hergestellt. Die nach herkömmlichen Methoden gewonnenen Derivate besaßen dieselben chromatographischen und photometrischen Eigenschaften (Tab.7.), wie die unter vorgenannten Bedingungen hergestellten Verbindungen. Die Wellenlänge der Absorptionsmaxima ist charakteristisch für die Stellung der Oxogruppe und unabhängig von dem Verbindungstyp, sodaß die Spezifität entwickelter Verfahren sich hierdurch gleichfalls überprüfen läßt. Es besteht nämlich offenbar ein Zusammenhang zwischen Wellenlänge und zugehöriger Molekularextinktion. Wenn man die Molekularextinktionen durch die Zahl der reaktionsfähigen Ketogruppen im Molekül dividiert und diese Quotienten als Funktion der Wellenlänge des jeweiligen Maximums graphisch aufträgt, so ergibt sich eine Kurve, die von der chemischen Struktur unabhängig scheint (Abb.5.). Vor der 2,4-Dinitrophenylhydrazin-reaktion wiesen die untersuchten Verbindungen innerhalb des betroffenen Wellenlängenbereiches von 330-430 mμ keine Absorption auf. Dieser Befund kann unter Umständen als zusätzlicher Anhaltsprunkt bei der Untersuchung von Oxoverbindungen unbekannter Struktur von Bedeutung sein. Lassen sich doch solchermaßen Rückschlüsse auf das Molekulargewicht der zugrundeliegenden Verbindung ziehen. Wenn andererseits das Molekulargewicht in etwa bekannt ist, erhält man Hinweise auf Zahl und Stellung reaktionsfähiger Oxogruppen im Molekül.

Tab.7.

Photometrische Eigenschaften verschiedener 2,4-Dinitrophenylhydrazone.

Mono- oder Bis-2,4-Dinitrophenylhydrazon ("2,4-DNPH")	$\varepsilon_{Mol.}$	$\lambda_{max.}$
Dehydroepiandrosteron-2,4-DNPH	23200	370
Androsteron-2,4-DNPH	23550	370
Testosteron-2,4-DNPH	31000	390
Pregnenolon-2,4-DNPH	24150	378
Androstandion-bis-2,4-DNPH	46600	370
Androstendion-bis-2,4-DNPH	52200	381,5
Progesteron-bis-2,4-DNPH	55150	384,5
Hydrocortison-bis-2,4-DNPH	55200	384,5
Formaldehyd-2,4-DNPH	21600	351
Aceton-2,4-DNPH	22900	366
c-Hexanon-2,4-DNPH	23150	370
Acetophenon-2,4-DNPH	26800	383
Furfurol-2,4-DNPH	29400	388
2,4-Dinitrophenylhydrazin	14900	343

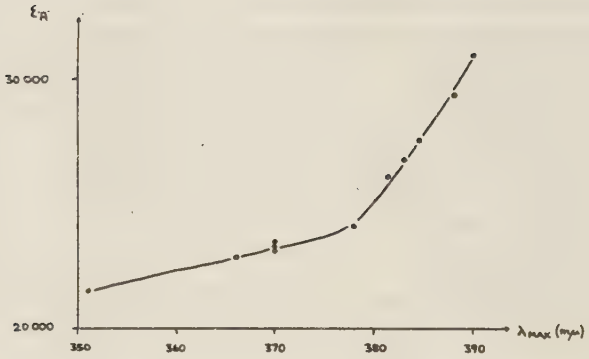


Abb.5.

Zusammenhang zwischen Äquivalentextinktionen $(\varepsilon_{\ddot{A}})^{\ast}$ und den entsprechenden Maxima.

---

* $\varepsilon_{\ddot{A}}$ definiert: $\varepsilon_{Mol.}/N_K$

$\varepsilon_{Mol.}$: Molare Extinktion

N_K : Zahl der 2,4-Dinitrophenylhydrazongruppen in dem Molekül.

4. Analyse verschiedener Steroide.

Was die praktische Anwendung der modifizierten 2,4-Dinitrophenylhydrazin-reaktion betrifft, so erwiesen sich zahlreiche Versuche mit biologischen Extrakten als notwendig. Insbesondere hinsichtlich der Frage, inwieweit Verunreinigungen aus Reagenzien und Extrakten, die im Laufe der Arbeit mit dem Reaktionsgemisch unvermeidlich in Berührung kommen, bei der Reaktion stören. Letztere erwies sich als relativ unempfindlich gegenüber den in Tab.8. aufgeführten Substanzen mit Ausnahme des Kieselgels G. Dieses dürfte eine Base enthalten, weil sich die durch Kieselgelextrakte verursachte Hemmung der 2,4-Dinitrophenylhydrazin-reaktion bei Waschen von organischem Extrakt mit Säure ausschalten ließ. Unter Berücksichtigung der vorstehenden Versuchsergebnisse wurden für die Praxis verhältnismäßig einfache Arbeitsvorschriften zur Bestimmung von verschiedenen Ketosteroiden entwickelt. Daß dabei kleiner Modifikationen je nach Art und Menge des untersuchten Materials (Harn, Plasma, Gewebeextrakte u.s.w.) notwendig sind, scheint verständlich. In allen hier beschriebenen Methoden wurden die üblichen Zuverlässigkeitskriterien als Maßstab für ihre Brauchbarkeit benutzt. Aufgrund dieser Kontrolle erwiesen sich nachstehende Bestimmungsverfahren der bisher vorzugsweise eingesetzten Zimmermann-reaktion als überlegen, vor allem wegen ihrer gesteigerten Empfindlichkeit und Spezifität, wie auch der universelleren Brauchbarkeit.

Tab.8.

Einfluß von Fremdstoffen auf die 2,4-Dinitrophenylhydrazinreaktion.
Ergebnisse als korrigierte Absorption/10,0 µg Dehydroepiandrosteron/3,0 ml Chloroform.

Art der Verunreinigung	Trichloressigsäurekonzentration (µg/ml)				
	200	300	400	800	1000
Extrakt aus Kieselgel G	0,060	0,055	0,072	0,059	0,068
Trockenrückstand von dest. Wasser	0,312	-	-	-	-
Spülmittel "Rei 65"	0,317	-	-	-	-
Propylenglycol	0,312	-	-	-	-
Kontrollversuch	0,316				

A. Bestimmung von freiem Ätiocholanolon im Plasma.

Im Verlauf von je 15 Wiederauffindungsversuchen mit 0,2 und 1,0 µg Ätiocholanolon in 10 ml Sammelplasma, welches 0,32 µg Ätiocholanolon/100 ml enthielt, konnten 0,15 ± 0,02 bzw. 0,81 ± 0,07 µg zugesetzte Steroide nachgewiesen werden (Tab. 9.), sodaß Richtigkeit (75% bzw. 81%) und Genauigkeit (±13,3% bzw. ±8,9%) des Verfahrens als ausreichend anzusehen sind. Die Empfindlichkeit, gegeben durch molare Extinktionskoeffizienten und das Volumen der Endlösung, liegt bei 0,1 µg/3,0 ml. Was die Spezifität der Methode anbetrifft, so wird diese durch Dünnschichtchromatographie der Derivate (evtl. auch die der freien Steroide) gewährleistet. Durch die erneute Dünnschichtchromatographie der Derivate erreicht man ohne nennenswerte Verluste die Entfernung der Verunreinigungen, welche unter Umständen das Absorptionsmaximum verschieben.

B. Bestimmung von freiem Progesteron im Plasma.

Bei je 20 Wiederauffindungsversuchen mit 0,2 und 1,0 µg Progesteron in 10 ml Sammelplasma gesunder Männer ließen sich 0,16 ± 0,02 bzw. 0,81 ±0,09 µg zugegebenen Progesterons in den Endlösungen feststellen (Tab.9.). Die Richtigkeit der Analysen lag somit bei 79% bzw. 81%, die Genauigkeit bei ±13,0% bzw. 11,3%. Hinsichtlich der Empfindlichkeit konnte 0,1 µg Progesteron in 3,0 ml Chloroform mit ausreichender Genauigkeit nachgewiesen werden. Die Spezifität der Methode ergibt sich aus der Dünnschichtchromatographie des freien Progesterons und seines Derivats.

Tab.9.

Wiederauffindungsversuche aus Plasma mit 1,0 und 0,2 µg zugesetztem Ätiocholanolon und Progesteron.

	Ätiocholanolon		Progesteron	
	1,0 µg	0,2 µg	1,0 µg	0,2 µg
	0,75	0,13	0,74	0,14
	0,76	0,14	0,74	0,14
	0,77	0,14	0,75	0,15
	0,78	0,14	0,75	0,15
	0,79	0,15	0,76	0,15
	0,80	0,15	0,78	0,15
	0,81	0,15	0,80	0,16
	0,81	0,15	0,81	0,16
	0,81	0,15	0,81	0,16
	0,82	0,15	0,81	0,16
	0,83	0,15	0,82	0,16
	0,84	0,16	0,82	0,16
	0,85	0,16	0,82	0,16
	0,86	0,16	0,83	0,16
	0,87	0,17	0,84	0,17
			0,84	0,17
			0,85	0,17
			0,86	0,17
			0,88	0,17
			0,89	0,18
M:	0,81	0,15	0,81	0,16
S:	0,04	0,01	0,05	0,01

M: Mittel

S: Standardabweichung

C. Bestimmung von 17-Ketosteroiden im Plasma.

Zehn Wiederauffindungsversuche mit je 5,0 µg Dehydroepiandrosteron, 2,0 µg Androsteron und 1,0 µg Ätiocholanolon, die 5 ml Sammelplasma zugesetzt wurden, führten zu einem Nachweis von 3,42-4,11 µg (Mittel 3,79 µg) Dehydroepiandrosteron, 1,20-1,64 µg (Mittel 1,46 µg) Androsteron und 0,61-0,90 µg (Mittel 0,72 µg) Ätiocholanolon (Tab.10.). Entsprechende Experimente mit den gleichen Mengen der angegebenen Steroide in 5-proz. wässriger Albuminlösung ergaben eine vergleichbare Wiederauffindungsrate von 79% Dehydroepiandrosteron, 82% Androsteron und 80% Ätiocholanolon. Die Abweichung der Einzelwerte vom Mittel betrug bei diesen beiden Versuchen ±6,2% für Dehydroepiandrosteron, ±7,5% für Androsteron und ±9,7% für Ätiocholanolon. Richtigkeit und Genauigkeit der Analysenmethode können daher als ausreichend betrachtet werden. Ihre Empfindlichkeit , die von dem molaren Extinktionskoeffizienten der Monoketosteroidderivate (Tab.7.) abhängt, liegt bei 0,1 µg. Auch die Spezifität des Verfahrens, welche auf einer 1-2-maliger Dünnschichtchromatographie der Derivate beruht, genügt den Anforderungen.

D. Bestimmung von 17-Ketosteroiden im Urin.

Von den zu 10 ml Urin zugesetzten 14,9 µg Natrium-dehydroepiandrosteronsulfat (=10,0 µg Dehydroepiandrosteron) und Natrium-androsteronsulfat (10,0 µg Androsteron) wurden 9,2 µg Dehydroepiandrosteron und 9,1 µg Androsteron wiedergefunden, sodaß die Richtigkeit 92% bzw. 91% beträgt.

Tab.10.

Wiederauffindungsversuche aus Plasma mit je 5,0 µg Dehydroepiandrosteron, 2,0 µg Androsteron und 1,0 µg Ätiocholanolon.

Dehydroepiandrosteron (5,0 µg)	Androsteron (2,0 µg)	Ätiocholanolon (1,0 µg)
3,42	1,20	0,61
3,60	1,35	0,64
3,70	1,40	0,67
3,75	1,44	0,69
3,78	1,46	0,71
3,80	1,47	0,71
3,84	1,51	0,74
3,89	1,55	0,74
4,01	1,58	0,79
4,11	1,64	0,90
M: 3,79	1,46	0,72
S: 0,20	0,13	0,08

M: Mittel

S: Standardabweichung

Tab.11.

Wiederauffindungsversuche mit 17-Ketosteroiden aus Urin.

Urin (10 ml)	+14,9 µg DHEA-SO_4-Na (=10,0 µg DHEA)	Urin (10 ml)	+14,9 µg Andro-SO_4-Na (=10,0 µg Andro)	Urin (10 ml)	+16,9 µg Andro-Gluc.-Na (=10,0 µg Andro)
10,3	18,6	20,5	27,5	10,8	20,3
8,9	19,9	20,6	28,8	10,3	19,5
10,4	18,8	22,2	32,8	11,3	20,7
9,3	18,3	20,3	31,4	10,3	20,1
10,1	19,1	21,8	30,0	11,0	20,6
9,1	18,4	19,9	29,6	10,4	19,7
M: 9,7	18,9	20,9	30,0	10,7	20,2
S: 0,7	0,6	0,9	1,5	0,4	0,5

M = Mittel

S = Standardabweichung

Aus 16,9 µg Natrium-androsteronglucuronosid (=10,0 µg Androsteron) in 5 ml Urin wurden unter ähnlichen Bedingungen 93-96% wiedergefunden. Die Abweichung der Einzelwerte betrug bei einer Endkonzentration von 5,6 µg Dehydroepiandrosteron ±0,4, bei einer solchen von 23,4 µg Androsteron ±1,2 µg und bei einer Konzentration von 17,3 µg Ätiocholanolon ±0,9 µg (Tab.11.). Die Genauigkeit von 7,1%, 5,1% und 5,3 % entspricht den Anforderungen. Bei Verwendung normaler Küvetten von 3 ml Inhalt können 0,1 µg 17-Ketosteroide mit ausreichender Genauigkeit gemessen werden. Für die notwendige Spezifität sorgt die Dünnschichtchromatographie in entsprechenden Lösungsmittelsystemen, vermittels deren die einzelnen 17-Ketosteroide sowohl voneinander, als auch von unspezifischen Nebenprodukten und Reagenzüberschuß zu trennen sind.

5. Radiochemische Versuche.

Die Bestimmung niedrigster Konzentrationen von Ketosteroiden wie Testosteron, Progesteron u.a. im Blutplasma stellt eine schwierige Aufgabe dar; vor allem weil das Ausgangsmaterial nur in beschränkten Mengen zur Verfügung steht. Um eine zuverlässige photometrische Bestimmung von Testosteron in menschlichem Plasma durchzuführen, würde man mindestens 100 ml Plasma oder etwa 200 ml Blut benötigen. Der Einsatz radioaktiv-markierten Reagenzes sollte hingegen eine brauchbare, hochempfindliche Messung ermöglichen, vorausgesetzt, daß die spezifische Aktivität hoch genug ist.

Man versuchte zunächst die Einführung radioaktiven 2,4-Dinitrophenylhydrazins durch Austauschreaktion. Es glichen die Reaktionsbedingungen denjenigen der üblichen 2,4-Dinitrophenylhydrazin-reaktion. Der Austausch verlief jedoch auch bei Temperaturen bis zu 70° C zu langsam, als daß ein solches Verfahren in Betracht käme (Tab.12.). Anschließend wurde Testosteron mit radioaktivem Reagenz in das 2,4-Dinitrophenylhydrazon überführt. Trotz mehrfacher Chromatographie gelang es nicht, das Derivat in ausreichendem Maße zu reinigen. Der Leerwert enthielt stets signifikante Radioaktivität und schwankte zudem derart, daß eine zuverlässige Bestimmung erst in dem Bereich der auch photometrisch erfassbaren Testosteronmengen möglich war (Tab.13., Abb.6.). Bei der 2,4-Dinitrophenylhydrazin-reaktion entstehen nämlich zahlreiche Nebenprodukte, die bei Photmetrie selbst kleinster Steroidmengen nach 2maliger Chromatographie nicht mehr stören. Oder aber die Störung wird durch Anwendung der Korrektur nach Allen (38) wie auch durch die photometrischen Eigenschaften des Derivats weitgehend ausgeschaltet. So besitzt das Reagenz bei seinem Absorptionsmaximum (343 mμ) einen molaren Extinktionskoeffizienten von 14900 gegenüber 21500-31000 pro Oxogruppe eines 2,4-Dinitrophenylhydrazons mit einem Absorptionsmaximum zwischen 351-390 mμ. Bei einer Bestimmung mit ^{3}H-2,4-Dinitrophenylhydrazin besitzen auch die Spaltprodukte des Reagenzes dessen spezifische Aktivität und verhindern entsprechende Korrekturen. Nicht einmal die Einführung einer sogenannten "Background-aktivität" brachte Erfolg, da diese, wie schon gesagt, schwankte und bei der Testosteronbestimmung in die Größenordnung signifikanter Konzentrationsunterschiede fiel (Tab.13.).

Tab.12.

Austauschreaktion zwischen Testosteron-2,4-dinitrophenylhydrazon und 1,3,5-^{3}H-2,4-Dinitrophenylhydrazin.

Reaktionsdauer (Stunden)	Reaktionstemperatur							
	38° C				70° C			
	ε_{korr}	µg	dpm	Ausbeute (%)	ε_{korr}	µg	dpm	Ausbeute (%)
1,0	-	-	-	-	0,237	4,74	298	2,94
2,0	-	-	-	-	0,246	4,92	292	2,78
2,5	0,180	3,60	200	2,78	-	-	-	-
4,0	0,220	4,40	510	5,42	0,230	4,60	955	9,70
11,5	0,223	4,45	720	7,57	-	-	-	-
24,5	0,183	3,70	700	8,84	-	-	-	-
29,5	0,185	3,75	1000	12,45	-	-	-	-
34,5	0,218	4,36	1690	18,12	-	-	-	-

Tab.13.

Bestimmung von Testosteron mit 1,3,5-^{3}H-2,4-Dinitrophenylhydrazin.

Testosteronmenge (µg)	Radioaktivität (dpm)
0,000	424
0,000	233
0,000	360
0,000	380
0,000	412
0,000	450
0,000	410
0,013	640
0,026	777
0,026	738
0,026	623
0,026	700
0,026	930
0,026	831
0,026	1158
0,078	1938
0,130	3328
0,182	4155

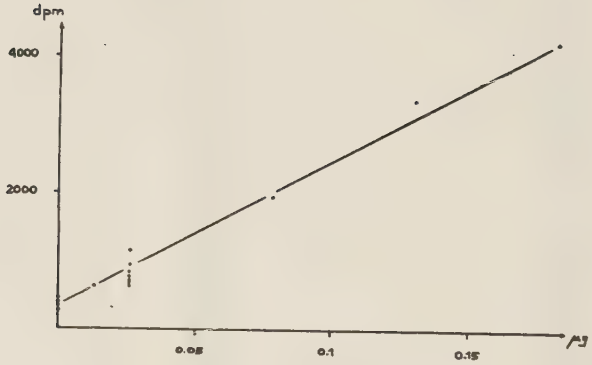


Abb.6.

Eichkurve für die Bestimmung von Testosteron mit 1,3,5-^{3}H-2,4-Dinitrophenylhydrazin.

Die 2,4-Dinitrophenylhydrazin-reaktion eignet sich daher wohl eher für die photometrische Auswertung.

6. Bestimmung von Oxysteroiden mittels der 2,4-Dinitrophenylhydrazin-reaktion nach entsprechender Oxydation.

Die Überführung von Alkoholen in die entsprechenden Oxoverbindungen durch Oxydation bot die Möglichkeit einer Ausdehnung der 2,4-Dinitrophenylhydrazin-reaktion auf die Bestimmung alkoholischer Steroide. Nichtketonische Oxysteroide lassen sich mit ausreichender Zuverlässigkeit oft nur nach mühsamen Trenn- und Reinigungsverfahren vermittels mehr oder weniger spezifischer Farbreaktionen nachweisen. Für Verbindungen mit 3ß-Hydroxy-Δ^5-konfiguration steht z.B. die Farbreaktion mit konz. Schwelfelsäure oder Äthanol/Schwefelsäure zur Verfügung (39). Pregnantriol reagiert mit konz. Schwelfelsäure (40), Pregnandiol mit konz. Schwefelsäure-Methanol-Äthylenglykolsulfit (3:0,5:0,5 V/V) (41) zu gelben Chromogenen. Diese Reaktionen haben alle den Nachteil, daß die Steroide im Verlaufe der Farbreaktion verloren gehen. Bei ungenügender Reinigung oder Auftrennung ist eine Analyse von Oxysteroiden durch anwesende unspezifische Chromogene ebenso in Frage gestellt wie bei der Zimmermann-reaktion. Zur Abhilfe wurde daher die Oxydation von alkoholischen Steroiden und die anschließende Reaktion mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin versucht. Bei entsprechender Wahl der Reaktionsbedingungen erhielt man nach Oxydation und 2,4-Dinitrophenylhydrazin-reaktion die 2,4-Dinitrophenylhydrazone der von Oxysteroiden abgeleiteten Diketone wie Androstandion

Tab.14.

Oxydation verschiedener Hydroxysteroide (Ausbeute in %).

	Androstandiol					Ätiocholandiol	Pregnandiol		Pregnantriol
2-proz. CrO_3 in Eisessig (ml/10 ml Äther)	0,01	0,03	0,05	0,10	0,30	0,30	0,10	0,30	0,10
Reaktionsdauer (Stunden)									
0,15	-	-	-	-	28,1	45,1	-	61,4	-
0,50	-	-	47,3	-	59,4	57,3	52,0	102,5	-
1,00	-	-	64,5	65,0	46,2	54,8	85,0	83,3	28,0
1,75	-	-	-	-	-	-	57,0	-	-
2,00	-	-	-	85,0	47,4	75,0	-	78,1	74,0
3,00	-	-	62,0	85,2	49,5	75,8	-	79,8	-
3,25	-	-	-	-	-	-	-	-	64,0
5,00	-	-	67,2	82,5	-	-	-	78,0	66,0
5,30	-	-	-	-	-	-	-	-	75,0
6,00	-	-	-	74,0	-	-	-	-	-
7,00	-	-	75,1	88,6	-	-	-	-	60,0
8,50	-	-	-	-	-	-	-	-	64,0
9,00	-	-	-	72,4	-	-	-	-	-
15,00	-	-	-	-	-	-	70,0	-	-
24,00	29,3	53,8	71,0	59,7	47,5	75,3	-	80,2	93,0

aus Androstan-3α,17β-diol, Ätiochoandion aus Ätiocholan-3 ,17β-diol, Pregnandion aus Pregnan-3α,17α-diol, sowie Ätiochoandion aus Pregnan-3α,17α,20α-triol. Bei letzterer Verbindung fand eine Abspaltung der Seitenkette statt. Zur Oxydation benutzte man eine modifizierte Chromsäureoxydation. Da bei Oxysteroiden vom Typ der 3β-Hydroxy-Δ^5-diole keine entsprechenden Oxoverbindungen auftraten, die mit dem 2,4-Dinitrophenylhydrazin-reagenz reagiert hätten, ist eine gewisse Selektivität anzunehmen. Die oben aufgeführten Verbindungen ließen sich nur mit unterschiedlicher Geschwindigkeit oxydieren, wobei die maximale Ausbeute je nach Steroid innerhalb von 1-24 Stunden erreicht wurde (Tab.14.). Die Prüfung einzelner Lösungsmittel ergab als günstigstes ein Gemisch von Äther-Eisessig (10:0,1 V/V). Die hier beschriebene Oxydation diente u.a. der Charakterisierung von Steroiden im Verlauf wissenschaftlicher Untersuchungen.

7. Photodensitometrie.

Der Gedanke einer direkten densitometrisch-photometrischen Bestimmung von Ketosteroid-2,4-dinitrophenylhydrazonen auf den Dünnschichtchromatogrammen entsprang der Erfahrung, daß eine visuelle Betrachtung der Farbintensität einzelner Zonen bereits die semiquantitative Abschätzung von Mengen zwischen 1-20 µg gestattet. Eine eindeutige quantitative Aussage war nur durch Einsatz eines geeigneten Gerätes zu erwarten, das auch dem Wunsch nach schnellerer Ausführung der Messungen entgegenkommt.

Die densitometrische Auswertung angefärbter Elektropherogramme in der Proteinchemie ist seit vielen Jahren bekannt (52, 53). Für derartige Messungen empfahlen sich das ANALYTROL Model RB der Firma Beckman und der SCHWÄRZUNGSMESSER der Dr. Bruno Lange GmbH (Hauptkatalog 1967, Bestell-Nr. 1310). Nach vielversprechenden Vorversuchen mit dem Schwärzungsmesser wurde schließlich das "Spectrodensitometer for chromatography" der Schoeffel Instrument-Co. (Analtech Inc. 100. S. Justison Street, Wilmington, Del. 19801. USA; Abb.7.) erprobt. Letzteres Gerät arbeitet mit seinem Monochromator im Wellenlängenbereich von 200-700 mμ. Der angeschlossene Schreiber und der Discintegrator ermöglichen die quantitative automatische Messung von Farbzonen auf Chromatogrammen. Die vorliegenden Untersuchungen bestätigen die Eignung der beschriebenen Methoden. Da die molaren Extinktionskoeffizienten der 2,4-Dinitrophenylhydrazone gegeben sind, kann die Empfindlichkeit eines Verfahrens nur durch Verwendung empfindlicherer Geräte heraufgesetzt werden. Während die Empfindlichkeitsgrenze für die herkömmlichen Photometer (Beckman, Eppendorf etc.) bei 100 ng/3 ml Lösung lag, sind mit dem Spektrodensitometer etwa 2 ng Monoketosteroid mit ausreichender Genauigkeit zu erfassen. Bis zu der untersuchten Höchstmenge von 10 μg verlief die Eichkurve linear (Abb.8. und 9.). Bei Bestimmungen von Dehydroepiandrosteron, Ätiocholanolon und Androsteron aus 0,1 ml Urin bzw. 0,2 ml Plasma benötigte man nicht einmal die empfindlichste Einstellung des Densitometers, um auswertbare Kurven zu erhalten (Abb.10., bzw. 11.).

Abb.7.

Spektrodensitometer für Chromatographie der Schoeffel Instrument-Co.

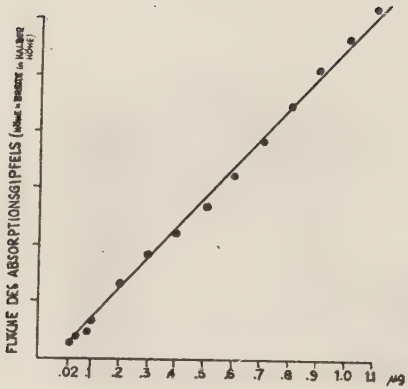


Abb.8.

Eichkurve für die densitometrische Bestimmung von Ketosteroiden (Empfindlichkeit: 0,5).

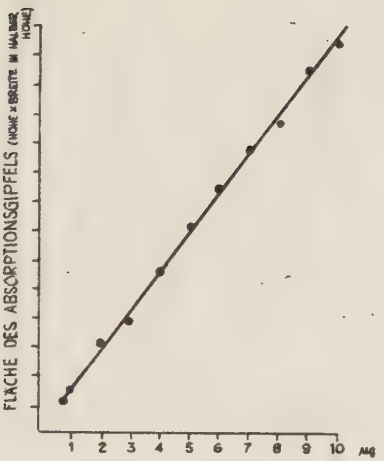


Abb.9.

Eichkurve für die densitometrische Bestimmung von Ketosteroiden (Empfindlichkeit: 1,5).

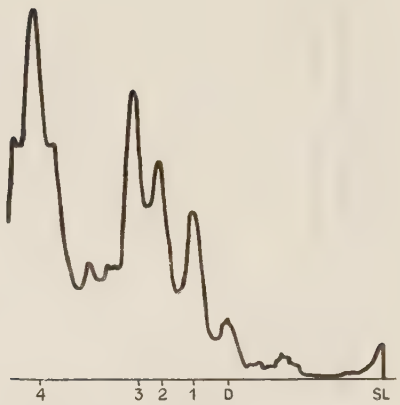


Abb.10.

Densitometrische Bestimmung von 17-Ketosteroiden aus Urin (0,1 ml).

SL: Startlinie
D : Reagenzüberschuß
1 : Dehydroepiandrosteron
2 : Ätiocholanolon
3 : Androsteron
4 : unspezifische Chromogene

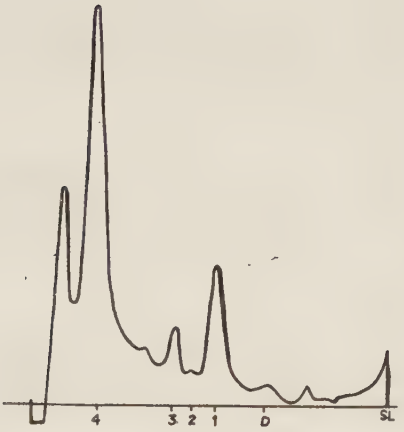


Abb.11.

Densitometrische Bestimmung von 17-Ketosteroiden aus Plasma (0,2 ml).

SL: Startlinie
D : Reagenzüberschuß
1 : Dehydroepiandrosteron
2 : Ätiocholanolon
3 : Androsteron
4 : unspezifische Chromogene

Tab.15.

Bestimmung von 17-Ketosteroiden im Urin mit Spektrodensitometer(b). Die Bestimmung erfolgte vergleichshalber auch mit Spektrophotometer (Beckman DK-2) (a). Ergebnisse in mg/24 Stunden.

Probe Nr.	Steroid	Duplikat I	Duplikat II	Mittel (a)	aus 0,1 ml, einmalige Chromatogr.	aus 0,5 ml, zweimalige Chromatogr.	aus 1,0 ml, zweimalige Chromatogr.	Mittel (b)
1	DHEA	2,78	2,70	2,74	2,2o	2,50	3,05	2,58
	Andro	5,93	6,58	6,25	5,50	6,40	5,85	5,91
	Ätio	3,60	4,83	4,21	3,85	4,00	4,10	3,98
2	DHEA	3,78	4,16	3,97	3,55	3,70	3,85	3,70
	Andro	4,48	5,02	4,75	4,70	4,60	4,90	4,73
	Ätio	4,36	5,04	4,70	4,05	4,45	4,55	4,35
3	DHEA	6,2o	6,28	6,24	6,55	5,95	6,10	6,20
	Andro	4,52	4,23	4,37	4,20	3,80	3,40	3,80
	Ätio	2,87	2,88	2,87	3,20	2,18	2,60	2,66
4	DHEA	3,45	3,28	3,36	2,95	3,35	3,20	3,20
	Andro	4,07	3,72	3,89	4,40	3,95	4,05	4,13
	Ätio	2,58	2,41	2,49	2,80	2,70	2,65	2,71
5	DHEA	3,37	3,69	3,53	3,10	3,25	3,45	3,26
	Andro	2,07	1,64	1,85	1,45	1,85	1,80	1,70
	Ätio	2,89	2,17	2,53	1,95	2,60	2,45	2,33
6	DHEA	2,40	2,95	2,67	2,05	2,70	2,85	2,53
	Andro	5,20	5,78	5,49	4,80	5,40	5,55	5,25
	Ätio	4,28	4,07	4,17	3,80	4,45	4,25	4,18

Tab.16.

Bestimmung von 17-Ketosteroiden im Plasma mit Spektrodensitometer (b) und Spektrophotometer (a). Ergebnisse in µg/100 ml.

Probe Nr.	Steroid	a) zweimalige Chromatogr.	b) einmalige Chromatographie, aus 2 ml	1 ml	0,2 ml	zweimalige Chrom. aus 2 ml	1 ml	Mittel
1	DHEA	152,6	145,0	138,0	143,0	165,0	160,5	150,3
	Andro	40,7	34,9	36,3	31,3	28,5	27,0	31,6
	Ätio	6,5	-	-	-	5,5	7,0	6,2
2	DHEA	233,0	245,0	-	228,0	221,5	220,5	228,7
	Andro	44,7	38,5	-	38,0	39,5	40,5	39,1
	Ätio	11,3	-	-	-	9,0	6,5	7,7
3	DHEA	221,0	190,0	-	175,0	187,5	182,0	183,6
	Andro	30,3	28,1	-	20,5	26,5	25,0	25,0
	Ätio	16,9	-	-	-	10,0	8,5	9,2
4	DHEA	196,8	157,5	162,0	172,0	175,5	-	166,7
	Andro	45,4	-	42,3	38,0	41,0	45,0	41,5
	Ätio	15,5	-	-	-	7,0	5,5	6,2
5	DHEA	145,1	-	167,0	148,0	157,0	162,0	158,5
	Andro	26,6	-	27,0	24,8	27,0	25,5	26,0
	Ätio	9,1	-	-	-	5,0	4,5	4,7
6	DHEA	169,8	-	155,5	178,0	-	162,0	165,1
	Andro	39,1	-	34,0	37,5	-	31,5	34,3
	Ätio	11,8	-	-	-	-	9,0	9,0

In ihrer Empfindlichkeit erreicht die Densitometrie mit dem angegebenen Gerät in etwa die gaschromatographischen Methoden, ohne jedoch deren Nachteil zu besitzen, wie ausgedehnte Vorreinigung, Verlust der Probe, Anfälligkeit gegenüber verunreinigenden Begleitstoffen etc. Weitere Vorteile sind bei der Spektrodensitometrie in der Erfassung der Gesamtmenge zu sehen, ohne daß die Spezifität wesentlich beeinträchtigt wird. Die Bestimmungsmethoden von Ketosteroiden und gewisser Hydroxysteroide dürfte mit Hilfe der beschriebenen 2,4-Dinitrophenylhydrazin-reaktion und ihrer densitometrischen Auswertung merklich erleichtert werden (Tab.15.).

8. Überprüfung der Spaltung von Steroid-konjugaten mittels der 2,4-Dinitrophenylhydrazin-reaktion.

Die meisten Steroide kommen in Körperflüssigkeiten überwiegend in konjugierter Form vor, sodaß ihre Bestimmung erst nach hydrolytischer Spaltung erfolgen kann. Neben Glucuronosiden finden sich vor allem Schwefelsäureester (47). Bei früheren Methoden zur Spaltung aller Konjugate bediente man sich der heißen Säurehydrolyse (2, 30, 31), die zwar eine quantitative Hydrolyse der Esterbindung von Steroidsulfaten wie der glucosidischen Bindung zwischen Steroid und Glucuronsäure herbeiführt, die aber gleichzeitig die Bildung von Artefakten begünstigt (36). So gehen z.B. unter derartig drastischen Bedingungen 11ß-Hydroxy-androsteron und 11ß-Hydroxy-ätiocholanolon teilweise in die entsprechenden $\Delta^{9(11)}$-Verbindungen über, während aus Dehydro-

epiandrosteron ein $\Delta^{3,5}$-Dien oder bei Verwendung von Salzsäure das 3ß-Chlor-dehydroepiandrosteron entsteht. Infolgedessen bevorzugte man später mildere Hydrolyseverfahren. Zu diesen ist z.B. die kontinuierliche Extraktion bei niedrigem pH zu zählen, die bei 24stündiger Anwendung von Äther und pH 1,0 eine schonende Spaltung der Steroid-sulfate gewährleistet. Auch ein gelegentliches Umschütteln des mit 50-proz. Schwefelsäure auf eine 2 N Säurelösung gebrachten Harns mit 1 Vol. Äther im Verlaufe von 120 Stunden genügt den Anforderungen (33). Desweiteren führt die Solvolyse von Butanol-extrakten des Harns mit Dioxan/Trichloressigsäure (32) oder die Bebrütung von Äthylacetat-extrakten (33), die bei pH 1 und 20-proz. Salzkonzentration gewonnen werden, zu einer quantitativen Spaltung der Steroid-sulfate. Steroid-glucuronoside werden unter solchen Bedingungen nicht angegriffen. Ihre Hydrolyse gelingt durch Bebrütung von Harn oder Harnextrakten mit ß-Glucuronidase (3, 50, 51). Daß unter den milden Bedingungen einer Solvolyse auch die Spaltung von 17-Ketosteroid-glucuronosiden (34, 35, 37) möglich ist, konnte kürzlich gezeigt werden. Ein solches Verfahren ist auf Grund der schonenden, schnellen und zuverlässigen Spaltung sämtlicher 17-Ketosteroid-konjugate den früheren Hydrolysenmethoden überlegen.

Die Anwendung der leicht durchführbaren modifizierten 2,4-Dinitrophenylhydrazin-reaktion sollte die Suche nach optimalen Bedingungen für eine Solvolyse erleichtern. In diesem Zusammenhange wurde zunächst die Reaktionsgeschwindigkeit der Solvolyse in 0,01 Mol Perchlorsäure in Äthylacetat gemessen. Die Ausbeute stieg zu Beginn rasch an, um

nach 1-2 Stunden das Maximum zu erreichen. Dann sank sie merklich ab und erreichte bald einen konstanten Wert. Während dieser Verlauf für Dehydroepiandrosteron und Androsteron galt, folgte die Spaltung von Ätiocholanolon-konjugaten einer Sättigungskurve. Je nach benutzter Säure wurde der konstante Hydrolysegrad früher oder später erreicht. Bei Anwendung von Schwefelsäure lag die maximale Ausbeute niedriger und die Abnahme der Ausbeute trat schneller ein als bei Benutzung von Salzsäure. Offensichtlich handelt es sich um 2 gleichzeitige Reaktionen, von denen die eine Steroide freisetzt, die andere aber -, welche nicht näher bekannt ist, - freie Steroide verbraucht. Letztere Reaktion verläuft in Gegenwart von Sulfationen schneller (Abb.12.) als bei Anwesenheit von Chloridionen (Abb.13.). Daß die Ausbeute gerade im Bereich ihres Maximums zeitabhängig ist, muß als zusätzlicher Nachteil angesehen werden. Man nahm bisher an, daß für die Abnahme der Ausbeute im Verlauf der Solvolyse von Harnextrakten andere im Urin vorkommende Verbindungen verantwortlich sind. Aus diesem Grunde wurden modifizierte Extraktionsverfahren mit Äthylacetat-Äther-Gemischen erprobt. Da die Versuche jedoch mit verschiedenen Harnproben durchgeführt wurden, ist eine Beurteilung der Experimente nur unter Berücksichtigung der prozentuellen Ausbeuten zu treffen (Tab.17.). Durch Extraktion konnten die Verunreinigungen nicht beseitigt werden. Es erschien jedoch bemerkenswert, daß Steroidsulfate und -glucuronoside sich mittels Äther aus der angesäuerten, wässrigen Phase extrahieren lassen. Weil die Extraktion mit Äther als zu

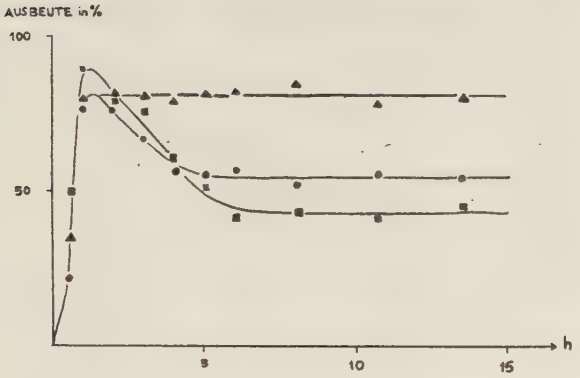


Abb.12.

Ausbeute an Steroiden bei der Solvolyse in 0,01 Mol. Perchlorsäure in Äthylacetat*.

●——●: Dehydroepiandrosteron
■——■: Androsteron
▲——▲: Ätiocholanolon

*Vor der Extraktion wurde mit Schwefelsäure angesäuert.

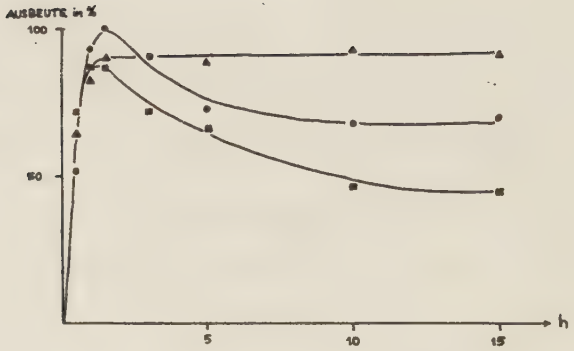


Abb.13.

Ausbeute bei Solvolyse in 0,01 Mol. Perchlorsäure in Äthylacetat.*

●——●: Dehydroepiandrosteron
■——■: Androsteron
▲——▲: Ätiocholanolon

---

*Vor der Extraktion wurde mit Salzsäure angesäuert.

Tab.17.

Extraktion von konjugierten 17-Ketosteroiden aus wässriger Lösung.(Ausbeute in %).

Zahl der Extraktion	Salzsäure Lösung				Schwefelsäure Lösung	
	Verhältnis von Äthylacetat zu Äther (V/V)					
	1:0	1:1	1:4	1:9	0:1	
1	77,50	60,30	49,63	59,03	35,08	31,82
2	10,80	22,00	24,52	10,77	19,82	19,85
3	5,30	9,23	5,90	9,00	12,11	11,93
4	3,14	4,52	5,05	6,84	8,99	8,70
5	1,96	2,36	3,68	5,36	5,50	7,62
6	1,18	1,57	2,62	3,70	4,50	4,98
Zurückgeblieben:	0,00	0,00	8,50	5,10	15,40	15,00

umständlich gelten dürfte - man benötigt eine 6malige Extraktion für die Gewimmung von etwa 85% der Gesamtkonjugate - versuchte man die Solvolyse in ätherischer Perchlorsäure nach üblicher Extraktion der Konjugate mit Äthylacetat. Von 10,0 µg zugesetztem konjugiertem Steroid fand man 9,2-10,2 µg wieder, was eine praktisch quantitative Solvolyse bedeutet (Tab.11.). Die Erhöhung der Perchlorsäurekonzentration bis zur Sättigung beschleunigt die Spaltung (Tab.18.). Wie aus der Hydrolysekurve hervorgeht (Abb.14.), fand keine "steroidverbrauchende" Reaktion statt. Die Ausbeute stieg kontinuierlich an und erreichte nach etwa 20 Stunden einen maximalen Wert, der einer quantitativen Ausbeute entsprach. Die in Abb.12. und 13. aufgeführten Werte sind daher auf die Ausbeute der Solvolyse in gesättigter ätherischer Perchlorsäurelösung bezogen, die mit 100% angenommen wurde. Die Ergebnisse der neuen Methode verglich man sodann mit den bislang üblichen Verfahren. Es wurden paralelle Bestimmungen von C_{19}-Ketosteroiden in Harnextrakten unter Verwendung der Zimmermann- und der 2,4-Dinitrophenylhydrazin-reaktion durchgeführt. Die Tab.19/a. und 19/b. fassen die Ergebnisse zusammen. Zur Spaltung der Konjugate benutzte man die Solvolyse in Äthylacetat/Perchlorsäure, Tetrahydrofuran/Perchlorsäure (34, 35) und Äther/Perchlorsäure (37). Zunächst ließ sich feststellen, daß die Ausbeute bei Äther/Perchlorsäure-solvolyse erheblich höher lag, gleichgültig, ob man die 2,4-Dinitrophenylhydrazin- oder die Zimmermann-reaktion verwandte. Dies galt

Tab.18.

Solvolyse von 17-Ketosteroid-konjugaten in Perchlorsäure-Äther (Ausbeute in µg).

Zeit (Stunden)	Dehydroepiandrosteron		Androsteron + Ätiocholanolon	
	Perchlorsäurekonzentration in Äther (%)			
	0,2	1,0	0,2	1,0
5	4,43	5,54	27,23	45,62
20	4,63	5,82	40,70	53,03
45	5,37	6,36	45,80	54,10
68	6,00	6,43	48,50	53,60

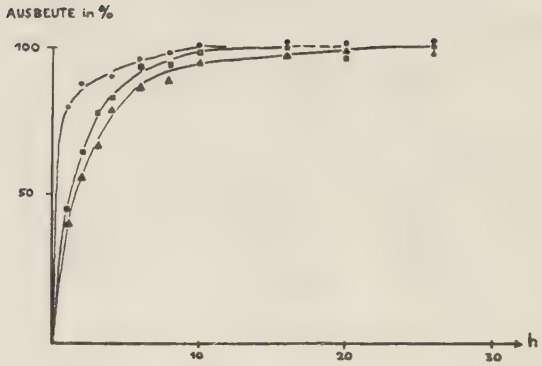


Abb.14.

Solvolyse von 17-Ketosteroidkonjugaten in Äther-60-proz. Perchlorsäure (110:1 V/V)*.

●——●: Dehydroepiandrosteron
■——■: Androsteron
▲——▲: Ätiocholanolon

*Gesättigte Lösung.

Tab.19.

Vergleich der 2,4-Dinitrophenylhydrazin-reaktion mit der Zimmermann-reaktion bei verschiedenen Solvolyse-verfahren. Ausbeute in µg.

a)

Zimmermann-r.	Gesamt-menge	DHEA	ÄTIO	ANDRO
Solvolyse in:				
Äthylacetat	168,5	-	-	-
Äther	232,5	-	-	-
Tetrahydrofuran	122,0	-	-	-
2,4-Dinitrophenyl-hydrazin-r.				
Solvolyse in:				
Äthylacetat	99,5	55,0	28,2	27,3
Äther	162,0	66,8	27,3	34,6
Tetrahydrofuran	-	49,3	10,5	14,3

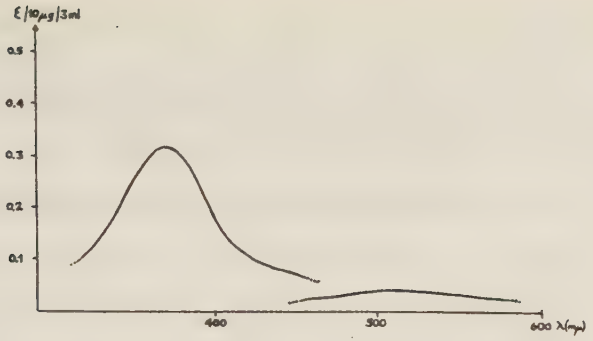
b)

Solvolyse in	Zimmermann-r.	2,4-Dinitrophenyl-hydrazin-r.
Äther	232,5	162,0
Äthylacetat	168,5	99,5
Unterschied:	64,0	62,5

	Äthersolvolyse	Äthylacetat-solvolyse
Zimmermann-r.	232,5	168,5
2,4-Dinitrophenyl-hydrazin-r.	162,0	99,5
Unterschied:	70,5	67,0

sowohl für die Bestimmung einzelner, wie auch der gesamten 17-Ketosteroide (Tab.19/a.). Beide Reaktionen zeigten die großen Verluste bei Anwendung der Äthyacetat-solvolyse auf. Diesen Resultaten zufolge lieferte die Zimmermann-reaktion scheinbar höhere Ausbeute an 17-Ketosteroiden. Wenn man jedoch die Farbreaktionen miteinander vergleicht, so stellt sich heraus, daß im Verlaufe der Zimmermann-reaktion auch unspezifische Farbkomplexe entstanden und höhere Konzentrationen an 17-Ketosteroiden vortäuschten (Tab.19/b.). Die Ergebnisse bestätigen frühere Befunde, daß die Zimmermann-reaktion ohne weitgehende Reinigung stets erheblich höhere Werte für 17-Ketosteroide liefert (3, 4). In der für die klinische Diagnostik verwendeten Form (2) ist die Bestimmung der 17-Ketosteroide nach Zimmermann als wenig spezifisch zu bezeichnen. Auch ihre Richtigkeit entspricht kaum den Anforderungen. Eine Vorstellung von den Leistungen beider Reaktionen gewinnt man, wenn man die Absorptionskurven gleicher Mengen von 17-Ketosteroiden als Zimmermann-chromogene oder als 2,4-Dinitrophenylhydrazone vergleicht (Abb.15.). So fällt außer der gesteigerten Empfindlichkeit der 2,4-Dinitrophenylhydrazin-reaktion die geringe Breite des Absorptionsmaximums in der Extinktionskurve von 2,4-Dinitrophenylhydrazonen auf. Verunreinigungen stören hier offensichtlich weniger als bei der Zimmermann-reaktion.

a)



b)

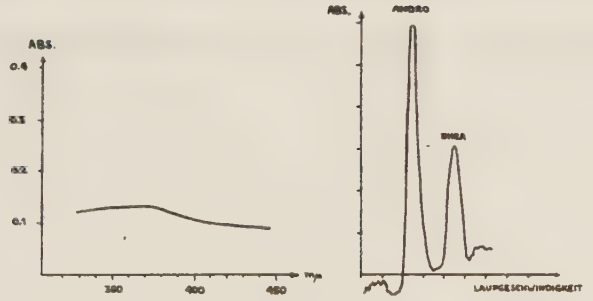


Abb.15.

a) Absorptionskurve von je 10 µg Androsteron als 2,4-Dinitrophenylhydrazon und Zimmermann-farbstoff im Bereich des Maximums (370 mµ bzw. 510 mµ).

b) 1,0 µg Androsteron mit Beckman DK-2 bzw. 0,1 µg Dehydroepiandrosteron und 0,2 µg Androsteron mit Photodensitometer als 2,4-Dinitrophenylhydrazon gemessen.

IV. VERSUCHE.

1. Ausarbeitung der optimalen Reaktionsbedingungen für die 2,4-Dinitrophenylhydrazin-reaktion.

A. Reaktionsgeschwindigkeit in Äthanol-Salzsäure.

In 10 Proben wurden jeweils 10 µg Androsteron und 200 µg 2,4-Dinitrophenylhydrazin zur Reaktion angesetzt. Zu dem Trockenrückstand gab man je 1 ml Äthanol-konz. Salzsäure (98:2 V/V) und ließ die Proben 5, 10, 20, 30, 45, 60, 75, 90, 120 und 180 Minuten im Wasserbad von 70° C stehen. Die Lösungen wurden anschließend eingedampft und der Rückstand mit Äthanol quantitativ auf eine Dünnschichtplatte mit aktiviertem Kieselgel G (Schichtdicke 0,3 mm) überführt. Die Entwicklung des Chromatogramms erfolgte im Lösungsmittelsystem Chloroform-Äthanol (19:1 V/V). Die sichtbaren Fraktionen mit Androsteron-2,4-dinitrophenylhydrazon wurden abgekratzt, mit Chloroform eluiert und das Eluat eingedampft. Die Trockenrückstände löste man in 3,0 ml Chloroform und bestimmte die Absorption im Beckman DK-2 Spektralphotometer zwischen 450 und 320 mµ. Die nach Allen (38) korrigierten maximalen Absorptionen sind in Abb.1. und Tab.2. zusammengestellt.

B. Bestimmung der erforderlichen Reagenzmenge für die Reaktion in Äthanol-Salzsäure.

Wie in der oben angegebenen Vorschrift wurden jeweils 10 µg Androsteron zur Reaktion gebracht. Die Konzentration an

2,4-Dinitrophenylhydrazin betrug 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 120, 200 und 300 µg. Die Reaktion wurde in 1 ml Äthanol-konz. Salzsäure (98:2 V/V) durchgeführt. Nach 2 Stunden bei 70-80° C dampfte man zur Trockne ein und überführte die Trockenrückstände auf die Dünnschichtplatte mit aktiviertem Kieselgel G. Das Chromatogramm wurde im Lösungsmittelsystem Chloroform-Äthanol (19:1 V/V) entwickelt. Man eluierte die Zonen von Androsteron-2,4-dinitrophenylhydrazon mit Chloroform, damfte ein und bestimmte die Absorption in 3,0 ml Chloroform. Die korrigierten Werte sind der Tab.3. und der Abb.2. zu entnehmen.

C. Auswahl eines geeigneten, in Benzol löslichen Katalysators.

Zu jeweils 10 µg Androsteron in 0,1 ml Äthanol gab man 40 µg 2,4-Dinitrophenylhydrazin (0,02 ml einer 0,2-proz. Lösung) in Äthylacetat, dampfte zur Trockne ein und versetzte mit 1 ml einer gesättigten Lösung von a) p-Toluolsulfonsäure, b) $AlCl_3$ in abs. Benzol bzw. c) einer 0,1-proz. Lösung von Trichloressigsäure in abs. Benzol. Man ließ die mit Schliffstopfen verschlossenen Gläschen 2 Stunden bei 70-80° C stehen, dampfte das Lösungsmittel bei 40° C ab und überführte den Rückstand auf eine Dünnschichtplatte mit aktiviertem Kieselgel G (Schichtdicke: 0,3 mm, Bahnbreite: je 2-3 cm). Die Entwicklung des Chromatogramms geschah im Lösungsmittelsystem Chloroform-Äthanol (19:1 V/V). Als Standard ließ man authentisches Androsteron-2,4-dinitrophenylhydrazon mitlaufen. Die der Referenzsubstanz ent-

sprechenden Zonen wurden abgekratzt, zweimal mit je 5 ml Chloroform eluiert, eingedampft und photometriert. Die korrigierte Absorption bei 370 mu geht aus Tab.1. hervor.

D. Bestimmung der erforderlichen Reagenzmenge für die Reaktion in Trichloressigsäure/Benzol.

8 Proben mit je 10 ug Androsteron wurden mit steigenden Mengen 2,4-Dinitrophenylhydrazin versetzt: 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 und 80 ug. Zu den Trockenrückständen fügte man 1 ml 0,1-proz. benzolische Trichloressigsäure-lösung und dampfte nach 2stündigem Stehen bei 70-80° C zur Trockne ein. Der Rücksrand wurde mit Benzol quantitativ auf eine Dünnschichtplatte aus aktiviertem Kieselgel G (Schichtdicke: 0,3 mm, Bahnbreite: je 2-3 cm) aufgetragen. Die Entwicklung der Platte erfolgte im Lösungsmittelsystem Chloroform-Äthanol (19:1 V/V). Die dem Standard entsprechenden Zonen wurden abgekratzt und zweimal mit je 5 ml Chloroform eluiert. Die Eluate wurden eingedampft und zur anschließenden Photometrie mit 3,0 ml Chloroform aufgenommen. Die erforderliche Mindestmenge ist aus Abb.2. und Tab.3. zu ersehen.

E. Bestimmung der erforderlichen Mindestmenge von Trichloressigsäure.

Zu 8 Proben mit je 10 ug Androsteron fügte man je 40 ug 2,4-Dinitrophenylhydrazin in Äthylacetat (0,2-proz. Lösung) und dampfte das Lösungsmittel ab. Der Trockenrückstand wurde in je 1 ml Benzol mit 1, 10, 30, 50, 100, 200, 500 und 1000 ug Trichloressigsäure gelöst. Nach 2stündigem Stehen

bei 40° C dampfte man die Proben bei 40° C ein und überführte den Rückstand mit Benzol auf eine Dünnschichtplatte aus aktiviertem Kieselgel G (Schichtdicke: 0,3 mm, Bahnbreite: 2-3 cm). Die Entwicklung des Chromatogramms erfolgte im Lösungsmettelsystem Chloroform-Äthanol (19:1 V/V). Die dem Standard entsprechenden Zonen wurden abgekratzt, zweimal mit je 6 ml Chloroform eluiert, eingedampft und der Rückstand in 3,0 ml Chloroform photometriert. Die Ergebnisse sind in Tab.4. zusammengefasst.

F. Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit bei verschiedenen Temperaturen.

Insgesamt 20 Proben mit je 10 µg Androsteron wurden mit 0,2 ml 0,2-proz. 2,4-Dinitrophenylhydrazin-lösung in Äthylacetat versetzt, zur Trockne eingedampft und mit je 1 ml 0,01-proz. Trichloressigsäure in absolutem Benzol zur Reaktion gebracht. Die Reaktionszeiten betrugen:

bei 70° C: 15, 30, 45, 60, 90, 120,
60° C: 15, 30, 60,
50° C: 15, 30, 60,
40° C: 15, 30, 60,
25° C: 5, 10, 15, 30 und 60 Minuten.

Nach Ablauf der Reaktion wurden die Proben wie zuvor beschrieben aufgearbeitet und die Derivate chromatographisch isoliert. Die Ergebnisse sind aus Tab.2. und Abb.1. ersichtlich.

G. Eichkurve für die Bestimmung von Androsteron.

8 Proben mit 0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 8,0, 10,0, 20,0 und 30,0 µg Androsteron wurden mit jeweils 0,05 ml 0,2-proz. 2,4-Dinitrophenylhydrazin in Äthylacetat zur Trockne gebracht. Der Rückstand wurde mit 1 ml 0,01-proz. Trichloressigsäure in Benzol aufgenommen und die Lösung im Wasserbad 15 Minuten auf 40° C erwärmt. Die Aufarbeitung des Reaktionsgemisches erfolgte wie hinlänglich beschrieben. Bei der Photometrie gegen Chloroform erhielt man die in Abb.3. gezeigten Ergebnisse.

H. Wiederauffindungsversuche.

Je 10 Proben von 2,0 µg 7α-^{3}H-Dehydroepiandrosteron (12 600 dpm) und 1,0 µg Androsteron wurden mit 0,05 ml 0,2-proz. 2,4-Dinitrophenylhydrazin in Äthylacetat zur Trockne eingedampft. Die Trockenrückstände nahm man in 0,01-proz. Trichloressigsäure in Benzol auf und brachte die Proben nach 15minütigem Stehen bei 40° C zur Trockne. Das Reaktionsgemisch wurde mit Benzol auf eine Dünnschichtplatte aus aktiviertem Kieselgel G (Schichtdicke: 0,3 mm, Bahnbreite: 2-4 cm) quantitativ überführt zusammen mit 2 Standards, die man aus je 5 µg Dehydroepiandrosteron und 5 µg Androsteron bereitete. Das Chromatogramm wurde im Lösungsmittelsystem Chloroform-Äthanol (19:1 V/V) entwickelt. Die Zonen ließen sich anhand der Referenzsubstanzen wie auch der Radioaktivität und Eigenfarbe lokalisieren. Sie wurden eluiert und der radiometrischen (Dehydroepiandrosteron) bzw. photometrischen Auswertung unterworfen. Zur Radioaktivitätsmessung wurde das Dehydro-

epiandrosteron-2,4-dinitrophenylhydrazon in 20 ml Szintillatorlösung in Toluol (0,4-proz. PPO und 0,004-proz. POPOP, Packard) aufgenommen und im Packard Tricarb Spektrometer Typ 3310 gemessen. Die Erfassung von Androsteron-2,4-dinitrophenylhydrazon erfolgte wie üblich photometrisch. Anhand der Eichkurve (Abb.3.) ließ sich die Konzentration der Derivate in den einzelnen Proben ermitteln. Die Resultate sind in Tab.5. zusammengestellt.

J. Störungen bei der 2,4-Dinitrophenylhydrazinreaktion.

Jeweils 10 µg Dehydroepiandrosteron wurden in Gegenwart von

a) wässrig-methanolischem Extrakt aus 5 g Kieselgel G,

b) Trockenrückstand von 10 ml destilliertem Wasser,

c) 1 mg Spülmittel ("REI 65").

d) 1 mg bei Papierchromatographie benutzten Propylenglykols zur Reaktion gebracht, die im übrigen den vorangehenden Vorschriften entsprach. Man chromatographierte im Lösungsmittelsystem Chloroform-Dioxan (94:6 V/V) und unterwarf die eluierten Derivate der Photometrie. Die korrigierte Absorption der einzelnen Proben ist aus Tab.8. zu entnehmen. Da sich der Extrakt aus Kieselgel G als störend erwies, wurde eine Ausschaltung der Störung durch Erhöhung der Katalysatorkonzentration versucht (Tab.8.), wobei man Extrakte aus jeweils 5 g Kieselgel G benutzte. Offensichtlich ließ sich der negative Einfluß von Kieselgel-G-extrakten nicht aufheben, sodaß man dazu überging, die in Äthylacetat gelösten Steroide durch Auschütteln mit 0,1 N HCl und Wasser von den störenden Begleitstoffen zu befreien. Derartige Ex-

perimente brachten stets den Standardversuchen entsprechende Resultate.

K. Reinigung von Steroid-2,4-dinitrophenylhydrazonen.

Fünf Proben von je 10 µg Androsteron wurden mit 0,1 ml 0,2-proz. 2,4-Dinitrophenylhydrazin in Äthylacetat versetzt, zur Trockne eingedampft und in 1 ml 0,03-proz. Trichloressigsäure in abs. Benzol aufgenommen. Nach 15 Minuten bei 40° C dampfte man zur Trockne ein und nahm den Rückstand in

a) 5 ml 0,1 N Natronlauge in Wasser,

b) 5 ml 1-proz. Brenztraubensäure in Wasser,

c) 5 ml 1-proz. Kaliumpermanganat in 10-proz. wässrigem Natriumcarbonat,

d) 5 ml 8-proz. Natriumbicarbonat in Wasser aufgenommen.

Die Lösungen wurden sofort mit 20 ml Benzol extrahiert, mit Wasser bis zu neutraler Reaktion gewaschen, eingedampft und in 3,0 ml Chloroform photometriert. Die fünfte Probe wurde als Bezugswert wie üblich behandelt, d.h. einer Dünnschichtchromatographie unterworfen und dann photometriert. Man erhielt folgende Werte für die korrigierte Absorption: a) 0,198, b) 0,177, c) 0,240, d) nicht auswertbar (Absorptionsmaximum stark verschoben). Bezugswert: 0,326. Die Probe d) wurde daraufhin wie die Bezugsprobe chromatographisch gereinigt und photometriert. Die korrigierte Absorption belief sich auf 0,318.

L. Vorschrift zur Ausführung der Bestimmung von Ketosteroiden mittels der 2,4-Dinitrophenylhydrazinreaktion.

Der bis zu 0,3 µMol Ketosteroid enthaltende, entsprechend vorgereinigte Rückstand wird mit 0,1 ml 0,2-proz. 2,4-Dinitrophenylhydrazin in Äthylacetat im Luftstrom bei 35-40° C zur vollkommenen Trockne gebracht. Anschließend löst man den Rückstand in 1,0 ml 0,03-proz. Trichloressigsäure in abs. Benzol und dampft nach 15minütigem Stehen bei 35-40° C im Luftstrom zur Trockne ein. Der Rückstand wird in wenig Chloroform aufgenommen und quantitativ auf eine Dünnschichtplatte mit aktiviertem Kieselgel G überführt (Schichtdicke: 0,3 mm, Bahnbreite: 2-4 cm). In gleicher Weise werden zu beiden Seiten der Probe jeweils 5 µg des entsprechenden Steroid-2,4-Dinitrophenylhydrazons als Standard aufgetragen. Die Entwicklung des Chromatogramms erfolgt in einem geeigneten Lösungsmittelsystem (Tab.6.), welches die einwandfreie Abtrennung überschüssigen Reagenzes von dem gesuchten Steroid-2,4-dinitrophenylhydrazon, bzw. die Trennung einzelner Steroidderivate voneinander gestattet. Die dem Farbfleck des jeweiligen Standards entsprechende Fraktion wird festgelegt, das Kieselgel abgekratzt und zweimal mit je 5 ml Chloroform eluiert. Man dampft die Lösung unter Stickstoff- oder Luftstrom bei 35-40° C zur Trockne ein, nimmt den Rückstand in 3,0 ml Chloroform auf und photometriert die Lösung. Anhand der korrigierten Absorption von

Probe und Standard gemäß der Formel:

$$Abs_{max.korr} = 2 \times Abs_{max.} - Abs_{max.-35\ m\mu} - Abs_{max.+35\ m\mu}$$

lässt sich der Gehalt der Probe an gesuchtem Steroid ermitteln. Der Standard ist mit einer Eichkurve, bzw. der spezifischen Absorption gemessenen Steroids zu ersetzen. Es ist empfehlenswert, kleinere Steroidmengen (unterhalb von 10 µg) in mindestens zwei verschiedenen Systemen zu chromatographieren, um die störenden Nebenprodukte mit Sicherheit abzutrennen. Sollte das Maximum verschoben sein, so ist eine nochmalige Chromatographie unentbehrlich.

2. Chromatographische Trennung von Steroid-2,4-dinitrophenylhydrazonen.

Die in der Tab.6. zusammengefassten Derivate wurden auf eine Dünnschichtplatte aus aktiviertem Kieselgel G (Schichtdicke: 0,3 mm, Bahnbreite: 1-1,5 cm) aufgetragen, wobei sich bereits 5 µg Substanzen deutlich erkennen ließen. Für die systematischen Untersuchungen chromatographischer Bedingungen wurden Chloroform-Dioxan-Gemische in verschiedenen Verhältnissen benutzt. Abb.4. veranschaulicht die Trennung verwandter Verbindungen, wobei die am häufigsten zu bestimmenden Substanzen besonders berücksichtigt wurden. In ähnlicher Weise versuchte man mittels anderer Systeme die Trennung solcher Derivate, die eine ähnliche Wanderungsgeschwindigkeit besaßen. Die Brauchbarkeit des Systems Tetrachlorkohlenstoff-Dioxan (4:1 V/V) geht aus Tab.6. hervor.

3. Bestimmung der molaren Extinktionskoeffizienten von 2,4-Dinitrophenylhydrazonen.

a) Je 1 mg Steroid und 10 mg 2,4-Dinitrophenylhydrazin wurden in 10 ml 0,01-proz. Trichloressigsäure in Benzol gelöst und auf 40° C erwärmt. Im Falle von Hydrocortison und Progesteron wurde das Reaktionsgemisch 0,5 Stunden unter Rückfluß gekocht,um die Löslichkeit der Reaktionskomponenten zu erhöhen. Man trennte die gesuchten Derivate durch Dünnschichtchromatographie von dem Reagenzüberschuß ab, eluierte mit Chloroform und kristallisierte die Derivate aus Äthanol-Wasser um.

b) Zu einer Lösung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin in Äthanol-konz. Salzsäure (9:1 V/V) wurde je 1 g Formaldehyd, Aceton, c-Hexanon, Acetophenon und Furfurol hinzugegeben und die Lösung im Wasserbad kurz auf 70° C erwärmt. Nach Abkühlen filtrierte man vom Niederschlag ab, wusch mit 0,1 N Salzsäure und Wasser und kristallisierte aus Äthanol-Wasser um. Die Photometrie erfolgte wie üblich in Chloroform mit Lösungen bekannter Konzentration. Aus den Messergebnissen ließ sich der molare Extinktionskoeffizient der einzelnen Derivate ermitteln (Tab.7., Abb.5.).

4. Anwendung der 2,4-Dinitrophenylhydrazin-reaktion bei Steroidbestimmungen in Körperflüssigkeiten.

A. Vorschrift zur Bestimmung von freien Steroiden im Plasma.

10-20 ml heparinisiertes Plasma werden mit 0,5 Vol. 0,25 N Natronlauge verdünnt und zweimal mit je 1 Vol. Methylenchlorid-Äther (1:4 V/V) extrahiert. Die vereinigten Extrakte wäscht man mit 0,2 Vol. Wasser, trocknet über Natriumsulfat und dampft unter Stickstoff bei 35-40° C zur Trockne ein. Das extrahierte Plasma wird für die Bestimmung von Steroidkonjugaten aufgehoben. Der Trockenrückstand wird zusammen mit etwa 250 mg Kieselgel (Fa. Merck) in 3 ml 70-proz. Methanol suspendiert und unter gelegentlichem Umschütteln mindestens 1 Stunde auf -15° C gekühlt. Man zentrifugiert die Suspension 10 Minuten bei 4000 U/Minute, dekantiert und wäscht mit 2 ml eiskaltem 70-proz. Methanol nach. Die völlig farblose Lösung wird schließlich mit 20 ml Äthanol-Benzol (1:1 V/V) versetzt und unter Stickstoff zur Trockne eingedampft. Die Steroide werden durch Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel G im Lösungsmittelsystem Chloroform-Äthanol (19:1 V/V) vorgereinigt. Anhand der entsprechenden Standardverbindungen lassen sich die Zonen mit den gesuchten Ketosteroiden festlegen. Man eluiert die Abschnitte mit 5 ml abs. Äthanol, filtriert die Lösung gegebenenfalls durch Filter der Firmen Whatmann (Nr.42) oder Machery u. Nagel (Nr.640 md) und dampft unter Stickstoff bei 35-40° C zur Trockne ein. Der trockene Rückstand wird in 30 ml

Äthylacetat aufgenommen, die Lösung mit 0,1 N Salzsäure extrahiert, mit Wasser bis zu neutraler Reaktion gewaschen und zur Trockne eingedampft. Man versetzt mit 0,1 ml 0,2-proz. 2,4-Dinitrophenylhydrazin-lösung in Äthylacetat und dampft zur Trockne ein. Der Rückstand wird sodann in 1,0 ml 0,03-proz. Trichloressigsäure in abs. Benzol aufgelöst, 30 Minuten auf 35-40° C erwärmt und wieder zur Trockne gebracht. Nun überführt man das Reaktionsgemisch mit Benzol auf die Platte mit einer 0,3 mm dicken Schicht aus aktiviertem Kieselgel G. Die Entwicklung des Chromatogramms erfolgt im Lösungsmittelsystem Chloroform-Dioxan (94:6 V/V). Die dem jeweiligen Standard entsprechende Zone eluiert man mit Chloroform und dampft ein. Zwecks besserer Reinigung werden die einzelnen Fraktionen nochmals im Lösungsmittelsystem Tetrachlorkohlenstoff-Dioxan (4:1 V/V) chromatographiert. Anhand passender Eichkurven lassen sich die Konzentrationen der Derivate ermitteln. Anstelle der Extraktion alkalischen Plasmas mit Methylenchlorid-Äther genügt auch ein zweimaliges Ausschütteln mit 2 Vol. Äther für die Entfernung freien Ätiocholanolons oder Progesterons.

B. Vorschrift zur Bestimmung von Dehydroepiandrosteron, Androsteron und Ätiocholanolon im Plasma.

Da die Konzentration freier 17-Ketosteroide im Plasma von Normalpersonen 1-2 µg nicht übersteigt - gegenüber 50-250 µg/100 ml an sulfokonjugierten 17-Ketosteroiden - kann in den meisten Fällen auf die Fraktion der freien

Steroide verzichtet werden, die somit für eine Bestimmung von freien Corticosteroiden zur Verfügung steht. Man extrahiert daher 5 ml heparinisiertes Plasma einmal mit 25 ml und einmal mit 10 ml eiskalten Methylenchlorids durch 30 Sekunden langes Schütteln. Die vereinigten Extrakte werden mit 5 ml 0,1 N Natronlauge und 5 ml Wasser gewaschen und der Analyse der 11-Hydroxycorticosteroide zugeführt.

Zur Gewinnung der gesamten Steroidkonjugate schüttelt man das präextrahierte Plasma mit 6 Vol. Äthanol-Aceton (1:1 V/V), saugt nach 30 Minuten bei 37° C vom ausgefällten Eiweiß ab und dampft das Filtrat im Rotationsverdampfer bei 35-40° C zur vollständigen Trockne ein. Der Rückstand wird in 2 ml Äthanol aufgenommen, mit 2 ml Aceton versetzt und erneut zur Trockne gebracht. Man nimmt den Rückstand mit 10 ml 30-proz. Ammoniumsulfatlösung auf, säuert mit 1 ml konz. Salzsäure an und extrahiert 3mal mit je 10 ml Äthylacetat. Die Äthylacetatphase wird sofort mit Ammoniaklösung neutralisiert und anschließend eingedampft. Der trockene Rückstand wird in 10 ml 70-proz. Methanol aufgenommen, mit etwa 250 mg Kieselgel (Fa. Merck) versetzt und zwecks Entfettung 3 Stunden auf -15° C abgekühlt. Durch Zentrifugieren für 5 Minuten bei 4000 U/Minute trennt man von ausgefallenen Lipoiden ab, dekantiert und dampft die vollkommen klare Lösung zur Trockne ein. Zu dem Trockenrückstand gibt man 30 ml Perchlorsäurelösung in Äther, die nach Vorschrift IV.-8.-D. hergestellt wird. Die Lösung wird mit lockerem Plastikstopfen in ein Wasserbad von 38-

40° C gestellt und erst bei beginnendem Sieden fest verschlossen. Nach 24 Stunden bei 37° C extrahiert man mit 10 ml Wasser, 10 ml 1 N Natronlauge und erneut mit Wasser bis zu neutraler Reaktion. Die Lösung wird eingedampft und der Trockenrückstand der unter IV.-1.-L. beschriebenen 2,4-Dinitrophenylhydrazin-reaktion unterworfen mit anschließender chromatographischer Abtrennung der gesuchten Derivate. Die quantitative Auswertung erfolgt durch Photometrie des Produktes unter Anwendung entsprechender Eichkurven. Bei Verschiebung des Absorptionsmaximums chromatographiert man das Derivat erneut in einem anderen geeigneten Lösungsmittelsystem wie z.B. in Tetrachlorkohlenstoff-Dioxan (4:1 V/V).

C. Vorschrift zur Bestimmung von 17-Ketosteroiden im Harn.

5-10 ml des 24-Stunden-urins sättigt man mit Ammoniumsulfat, säuert mit 0,5 bzw. 1 ml konz. Salzsäure an und extrahiert dreimal mit je 1 Vol. Äthylacetat. Die vereinigten Äthylacetat-extrakte werden sofort mit konz. Ammoniak neutralisiert und eingedampft. Zum Rückstand gibt man 30 ml 1-proz. Perchlorsäure in Äther und bebrütet 24 Stunden bei 37° C. Die Ätherlösung wird sodann mit 10 ml Wasser bis zu neutraler Reaktion gewaschen. Man dampft die Lösung zur Trockne ein, löst den Rückstand in 0,1 ml 0,2-proz. 2,4-Dinitrophenylhydrazin in Äthylacetat und dampft wieder ein. Der Rest wird in 1,0 ml 0,03-proz. Trichloressigsäure in abs. Benzol aufgenommen, 30-45 Minuten auf 37° C erwärmt und zur Trockne gebracht. Den Rückstand überführt man quantitativ auf eine

Platte mit einer 0,3 mm dicken Schicht aus aktiviertem Kieselgel G. Die Entwicklung des Chromatogramms erfolgt vorzugsweise im System Chloroform-Dioxan (94:6 V/V). Mittels der zu beiden Seiten aufgetragenen Standardsubstanzen werden die Zonen der gesuchten Verbindungen festgelegt, abgekratzt und mit Chloroform eluiert. Die Hauptbestandteile - Dehydroepiandrosteron, Androsteron und Ätiocholanolon als 2,4-Dinitrophenylhydrazone - lassen sich im allgemeinen durch einmalige Chromatographie isolieren, während die Gewinnung der 11-oxygenierten 17-Ketosteroide eine zweite chromatographische Reinigung erfordert. Hierfür eignen sich die Lösungsmittelsysteme Chloroform, Chloroform-Dioxan (9:1 V/V) und Chloroform-Äthanol (19:1 V/V). Die Eluate werden eingedampft, in Chloroform aufgenommen und photometriert. Um die unspezifische Absorption der Verunreinigungen auszuschließen, korrigiert man die maximale Absorption anhand der nachstehenden Formel (38):

$$Abs_{korr} = 2 \times Abs_{370} - Abs_{335} - Abs_{405}$$

Die quantitative Auswertung geschieht mit Hilfe einer aufzustellenden Eichkurve.

5. Versuche zur Bestimmungen von Ketosteroiden mit markiertem 2,4-Dinitrophenylhydrazin.

A. Herstellung des Derivats durch Austausch.

Je 5 µg Testosteron-2,4-dinitrophenylhydrazon wurden zusammen mit 40 µg 1,3,5-^{3}H-2,4-Dinitrophenylhydrazin (spezifische Aktivität: $2{,}3.10^{6}$ dpm/ µMol) in 1 ml 0,03-proz. Tri-

chloressigsäure auf 38° C bzw. 70° C erwärmt. Die Reaktionsdauer und die Umwandlungsrate sind aus Tab.12. ersichtlich. Bei vollständigem Austausch waren 10700 dpm/ 5 µg Testosteron zu erwarten. Die Reinigung der Derivate erfolgte in den Lösungsmittelsystemen Chloroform-Dioxan (94:6 V/V) und Chloroform. Zwecks Überprüfung der Reinheit wurde auch ein Leerwert entsprechend behandelt. Die Auswertung geschah sowohl photometrisch als auch radiometrisch, wodurch sich Verluste ermitteln ließen.

B. Reaktion von Testosteron mit 1,3,5-^{3}H-2,4-Dinitrophenylhydrazin.

Jeweils 6 Proben mit einem Testosterongehalt zwischen 0,000 und 0,182 µg wurden mit 40 µg 1,3,5-^{3}H-2,4-Dinitrophenylhydrazin (Spezifische Radioaktivität: 180 000 dpm/µMol) versetzt. Nach üblicher Reaktion reinigte man das Testosteron-2,4-dinitrophenylhydrazon durch Dünnschichtchromatographie in Chloroform-Dioxan (94:6 V/V), Tetrachlorkohlenstoff-Dioxan (4:1 V/V) und Benzol-Äthanol (9:1 V/V) auf Kieselgel G und bestimmte die Radioaktivität im Packard Tricarb Spektrometer, Mod.3010. Die Ergebnisse sind in Tab.13. und Abb.6. zusammengestellt.

C. Chromatographische Reinigung von Testosteron-2,4-dinitrophenylhydrazon.

Zur Festlegung des Leerwerts wurden sechsmal je 40 µg 1,3,5-^{3}H-2,4-Dinitrophenylhydrazin (Spezifische Radioaktivität: 180 000 dpm/µMol) wie bei der Farbreaktion behandelt.

Die Chromatographie erfolgte im Lösungsmittelsystem Chloroform-Dioxan (94:6 V/V) auf Kieselgel G. Als Referenzsubstanz ließ man Testosteron-2,4-dinitrophenylhydrazon mitlaufen. Die chromatographische Reinigung wurde dreimal wiederholt unter Verwendung von Benzol-Äthanol (9:1 V/V), Tetrachlorkohlenstoff-Dioxan (4:1 V/V) und Chloroform, wobei stets die dem Testosteron-2,4-dinitrophenylhydrazon entsprechenden Zonen eluiert und weiterverarbeitet wurden. Die Messung der Radioaktivität erbrachte die in Tab.13. zusammengestellten Ergebnisse.

6. Bestimmung von alkoholischen Steroiden mittels der 2,4-Dinitrophenylhydrazin-reaktion.

A. Versuche zur Oxydation alkoholischer Steroide.

Folgende Substanzen wurden der Oxydation unterworfen: Androstandiol, Ätiocholandiol und Pregnandiol. In vorausgegangenen Experimenten versuchte man zunächst die Oxydation von 20 μg in 1 ml 2-proz. CrO_3 in Eisessig bei Zimmertemperatur. Die Reaktionszeit betrug 30, 60 und 120 Minuten. Anschließend verdünnte man mit 10 ml Wasser und extrahierte mit Äther. Die Ätherextrakte wurden mit Wasser bis zu neutraler Reaktion gewaschen, nach Zugabe von ein paar Tropfen Methanol im Luftstrom bei 40° C eingedampft und der Trockenrückstand mit den gesuchten Diketonen der 2,4-Dinitrophenylhydrazin-reaktion unterworfen. Die Abtrennung der entsprechenden Bis-2,4-dinitrophenylhydrazone erfolgte chromatographisch im Lösungsmittelsystem Benzol-Diisopropyläther (9:1 V/V), die Auswertung visuell, d.h. semi-

quantitativ. Die gesuchten Zonen ließen sich nur schwach erkennen, was auf eine niedrige Ausbeute schließen ließ. Bei der Wiederholung benutzte man daher folgende Reaktionslösungen:

a) Äther-2-proz. CrO_3 in Eisessig (10:1 V/V); 30 oder 120 Minuten bei Zimmertemperatur,

b) Benzol-2-proz. CrO_3 in Eisessig (10:1 V/V); über Nacht bei Zimmertemperatur,

c) Äthylacetat-2-proz. CrO_3 in Eisessig (10:1 V/V); 60 Minuten bei Zimmertemperatur,

d) Aceton-2-proz. CrO_3 in Eisessig (10:1 V/V); 60 Minuten bei Zimmertemperatur und

e) Äther-Pyridin-2-proz. CrO_3 in Eisessig (5:5:1 V/V); 60 Minuten bei Zimmertemperatur.

Nach dem Ablauf der Oxydation wurden die Proben mit 20 ml Äther verdünnt, mit 10 ml 8-proz. Natriumbicarbonat und Wasser bis zu neutraler Reaktion gewaschen. Die organischen Phasen wurden eingedampft und der Trockenrückstand der üblichen 2,4-Dinitrophenylhydrazin-reaktion nach Vorschrift IV.-1.-L. unterworfen. Die Auswertung erfolgte visuell. Die Ausbeute an gewünschten Derivaten lag bei Verwendung von Äther-Eisessig am höchsten.

Aufbauend auf den Vorversuchen untersuchte man die Oxydation von Androstandiol, Ätiocholandiol, Pregnandiol und Pregnantriol. Jeweils 20 µg jeder Verbindung wurden in 10 ml Äther gelöst und mit 0,01, 0,03, 0,05, 0,10 und 0,30 ml 2-proz. CrO_3 in Eisessig versetzt. Die Reaktionsdauer bei Zimmertemperatur ist der Tab.14. zu entnehmen, die auch

die erzielten Ergebnisse enthält. Nach Ablauf der gewählten Reaktionszeit verdünnte man mit 20 ml Äther, extrahierte mit 8-proz. Natriumbicarbonatlösung und wusch anschließend mit Wasser bis zu neutraler Reaktion. Der Äther wurde eingedampft und der jeweilige Trockenrückstand der üblichen 2,4-Dinitrophenylhydrazin-reaktion nach IV.-1.-L. unterworfen. Die Chromatographie erfolgte im Lösungsmittelsystem Benzol-Diisopropyläther (9:1 V/V). Die durch die Farbe leicht erkennbaren Fraktionen wurden abgekratzt, mit Chloroform eluiert und die Eluate eingedampft. Zur quantitativen photometrischen Messung löste man den Rückstand in 3,0 ml Chloroform. Die Auswertung geschah anhand der entsprechenden Eichkurven. Das Absorptionsmaximum der Oxydationsprodukte von Androstandiol, Ätiocholandiol und Pregnantriol lag bei 370 mμ, das von Pregnandiol bei 372 mμ.

B. Vorschrift zur Bestimmung von Oxysteroiden (alkoholischen Steroiden).

Die bereits als freie Verbindungen abgetrennten alkoholischen Steroide überführt man in konische, mit Normalschliff versehene Zentrifugenröhrchen und dampft zu vollkommener Trockne ein. Der Trockenrückstand wird in 10 ml Äther gelöst und unter ständigem Schütteln langsam mit 0,10 ml 2-proz. CrO_3 in Eisessig versetzt. Die Reaktionszeiten betragen bei Zimmertemperatur für Androstandiol und Ätiocholandiol jeweils 3 Stunden, für Pregnandiol 1 Stunde und für Pregnantriol 24 Stunden. Nach Oxydation verdünnt man die

Proben mit 20 ml Äther, wäscht mit 10 ml 8-proz. Natriumbicarbonatlösung und sodann mit Wasser bis zu neutraler Reaktion. Die Ätherlösungen werden eingedampft und der jeweilige Trockenrückstand mit den entsprechenden Diketosteroiden der 2,4-Dinitrophenylhydrazin-reaktion unterworfen. Die Abtrennung der Bis-2,4-dinitrophenylhydrazone von Reagenzüberschuß und Nebenprodukten erfolgt vorzugsweise durch Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel G im Lösungsmittelsystem Benzol-Diisopropyläther (9:1 V/V). Zur photometrischen Auswertung lässt sich eine Eichkurve, oder aber ein unter gleichen Bedingungen oxydierter Standard bekannter Konzentration verwenden.

7. Densitometrische Auswertung der Chromatogramme.

A. Vorversuch mit dem Schwärzungsmesser der Dr. Bruno Lange GmbH, Berlin.

1,0, 2,0, 5,0, 10,0 und 20,0 µg Dehydroepiandrosteron wurden in konischen Reagenzröhrchen der üblichen 2,4-Dinitrophenylhydrazin-reaktion nach IV.-1.-L. unterzogen. Desweiteren gewann man einen Extrakt aus 10 ml Urin einer männlichen Normalperson gemäß der unter IV.-4.-C. angegebenen Vorschrift und arbeitete ihn in üblicher Weise auf. Alle 6 Proben wurden auf eine 0,3 mm dicke Schicht von aktiviertem Kieselgel G aufgetragen. Als Fließmittel diente Chloroform-Dioxan (94:6 V/V). Das entwickelte Chromatogramm wurde direkt der Densitometrie unterworfen. Die Gerätekombination bestand zunächst aus einem Schwärzungsmesser und einem Multiflex-Galvanometer Type MG2 oder MG3 als

Anzeigeinstrument. In diesem Falle wurde zur Durchführung einer Messung der Objekträger des Schwärzungsmesser um jeweils 1 mm verschoben. Die dabei erhaltenen Extinktionswerte wurden auf Millimeterpapier aufgetragen und lieferten die Extinktionskurve. Die Größe der Flächenintegrale gab Aufschluß über die Konzentration der Derivate in einzelnen Zonen. Bereits diese Vorversuche zeigten die Brauchbarkeit der Densitometrie für eine quantitative Analyse.

B. Untersuchungen mit dem Zweibandspektrodensitometer SD-3000 der Schoeffel Instrument-Co*

Zur Aufnahme einer Eichkurve benutzte man die 2,4-Dinitrophenylhydrazone von Dehydroepiandrosteron, Androsteron und Ätiocholanolon in Konzentrationen von 0,02-1,10 und 0,75-10,0 µg. Die Konzentration der Stammlösung wurde durch Photometrie im Beckman DK-2 Spektrophotometer überprüft. Man übertrug die entsprechende Menge Testsubstanz auf eine Platte mit aktiviertem Kieselgel (Analtech**, Schichtdicke 0,25 mm, Bahnbreite 1,0 cm) und ließ neben der Testbahn einen 1,0 cm breiten Leerstreifen, um die Eigenabsorption der Platte zu konpensieren. Das Chromatogramm wurde im Lösungsmittelsystem Chloroform-Dioxan (94:6 V/V) entwickelt und anschließend bei 367 mµ densitometriert. Durch Planimetrie der Absorptionskurven bzw. durch Berechnung gemäß

---

*Schoeffel Instrument-Co, 100 S. Justison Street, Wilmington, Del. 19801. USA.

**Analtech, Im. 100. S. Justison Street, Wilmington, Del. 19801. USA.

der Formel: $F = H \times B_{H/2}$,

F = Fläche
H = Höhe des Maximums
$B_{H/2}$ = Breite des Maximums in der halben Höhe.

lässt sich die Relation von Konzentration und Absorption ermitteln (Abb.8. und 9.).
Die R_f-Werte der gesuchten Derivate wurden daher anhand von jeweils 2,5 µg Standard (Dehydroepiandrosteron-, Ätiocholanolon- und Androsteron-2,4-dinitrophenylhydrazon; Abb.16.) festgelegt.

C. Photodensitometrische Auswertung bei 17-Ketosteroidbestimmungen im Urin.

Die Aufarbeitung von a) 0,1 ml (Abb.10.) und b) 0,5 ml (Abb.17. und 18.) Urin geschah nach der unter IV.-4.-C. angegebenen Vorschrift. Die densitometrische Bestimmung der einzelnen Fraktionen erfolgte gemäß der Vorschrift IV.-7.-B. Die Konzentration der Derivate ließ sich anhand der Eichkurven a) Abb.8. und b) Abb.9. errechnen. Bei ungenügender Reinigung erschien eine nochmalige Dünnschichtchromatographie in einem anderen Lösungsmittelsystem angezeigt (Abb.17. und 18.).

D. Photodensitometrische Auswertung bei 17-Ketosteroidbestimmungen im Plasma.

Die Aufarbeitung von 0,1-1,0 ml Plasma wurde gemäß der Vorschrift unter IV.-4.-B. vorgenommen. Bei Einsatz von 0,2 ml

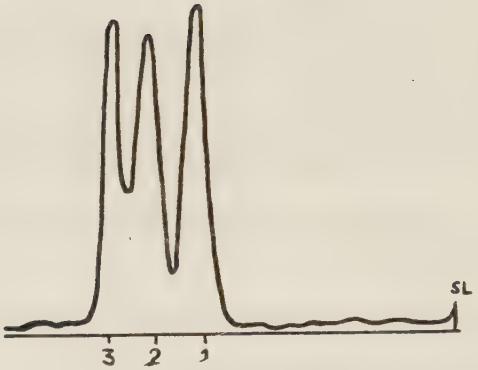


Abb.16.

Ermittlung der Wanderungsgeschwindigkeiten von Dehydroepiandrosteron-, Ätiocholanolon- und Androsteron-2,4-dinitrophenylhydrazon durch Spektrodensitometrie.

SL: Startlinie
1 : Dehydroepiandrosteron-2,4-dinitrophenylhydrazon
2 : Ätiocholanolon-2,4-dinitrophenylhydrazon
3 : Androsteron-2,4-dinitrophenylhydrazon.

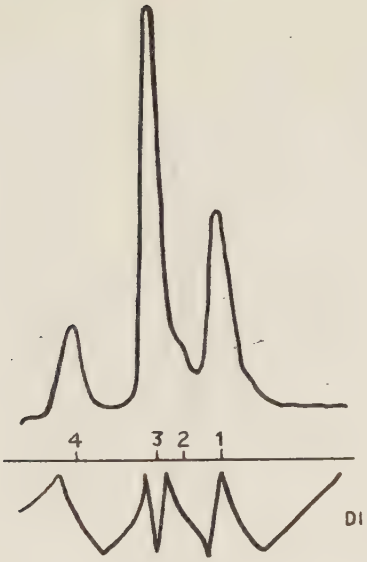


Abb.17.

Absorptionskurven von Dehydroepiandrosteron- (1) und Androsteron-2,4-dinitrophenylhydrazon (2) aus 0,5 ml Urin nach zweiter Dünnschichtchromatographie.

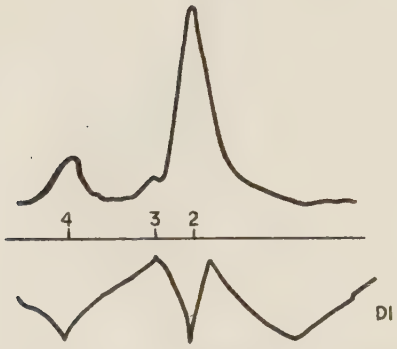


Abb.18.

Absorptionskurve von Ätiocholanolon-2,4-dinitrophenylhydrazon (2) aus 0,5 ml Urin nach zweifacher Dünnschichtchromatographie.

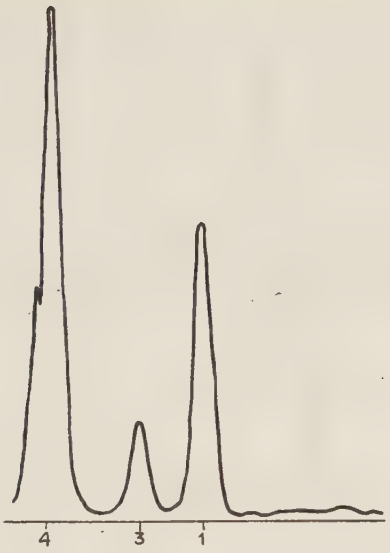


Abb.19.

Absorptionskurve von Dehydroepiandrosteron- (1) und Androsteron-2,4-dinitrophenylhydrazon (3) aus 1 ml Plasma nach zweifacher Dünnschichtchromatographie.

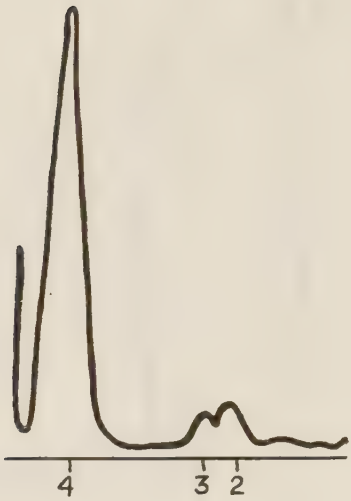


Abb.20.

Absorptionskurve von Ätiocholanolon-2,4-dinitrophenylhydrazon (2) aus 1 ml Plasma nach zweifacher Dünnschichtchromatographie.

bzw. 1,0 ml Plasma erbrachte die Densitometrie nach IV.-7.-B. die in Abb.11. bzw. 19. und 20 gezeigten Diagramme. Durch eine zweimalige Chromatographie ließ sich die hohe Leerabsorption vermeiden und eine einwandfreie Trennung erzielen. Die vorhandene Konzentration an Derivaten konnte anhand der Eichkurven (Abb.8. und 9.) ermittelt werden.

8. Überprüfung der Spaltung von Steroid-konjugaten aus biologischen Extrakten anhand der 2,4-Dinitrophenylhydrazin-reaktion.

A. Zeitlicher Verlauf der Solvolyse in Äthylacetat-Perchlorsäure.

Jeweils 10 ml Sammelurin wurden mit Ammoniumsulfat gesättigt und mit konz. Schwefelsäure auf pH 1 gestellt. Die Lösung extrahierte man dreimal mit je 10 ml Äthylacetat (36). Der organische Extrakt wurde sofort mit 0,3 ml konz. Ammoniak neutralisiert und bei 40° C im Luftstrom eingedampft. Zu den Trockenrückständen von 10 solchermaßen aufbereiteten Harnproben wurden jeweils 20 ml 0,01 N Perchlorsäure in Äthylacetat hinzugefügt und die Lösungen bei 50° C inkubiert. Die Reaktionszeit betrug 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 8,0, 10,0 und 20,0 Stunden. Anschließend extrahierte man die Äthylacetat-lösungen mit 10 ml 1,0 N Natronlauge, wusch mit Wasser bis zu neutraler Reaktion und dampfte zur Trockne ein. Die Rückstände wurden mit 1 ml 1-proz. Kalilauge in Äthanol aufgenommen und 1 Stunde bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Man verdünnte mit 10 ml Wasser und extra-

hierte die wässrig-äthanolische Phase mit 30 ml Äther. Die ätherischen Extrakte wurden mit Wasser bis zu neutraler Reaktion gewaschen, eingedampft und der 2,4-Dinitrophenylhydrazin-reaktion unterworfen (IV.-4.-L.). Die Abtrennung der wichtigsten Ketosteroide geschah durch Chromatographie im Lösungsmittelsystem Chloroform-Dioxan (94:6 V/V). Die Solvolysegeschwindigkeit von Dehydroepiandrosteron-, Ätiocholanolon- und Androsteron-konjugaten ist aus Abb.12. zu entnehmen. Abb.13. enthält die entsprechenden Resultate der Solvolyse, die bei Verwendung von konz. Salzsäure statt Schwefelsäure erhalten wurden.

B. Extraktion von Steroidkonjugaten aus wässriger Lösung.

Zur Extraktion von Steroidkonjugaten aus Harn erprobte man Äthylacetat-Äther-Gemische wechselnder Zusammensetzung. In jedem Versuch wurden 10 ml Sammelurin mit Ammoniumsulfat gesättigt, mit 1 ml 25-proz. Salzsäure angesäuert und sechsmal extrahiert. Die Extrakte wurden wie vorher beschrieben aufgearbeitet, d.h. mit Ammoniak neutralisiert, eingedampft und der Solvolyse in 0,01 N Perchlorsäure in Äthylacetat unterworfen. Nach Solvolyse und Spaltung der Acetate mit Kalilauge in Äthanol bestimmte man Androsteron mittels der 2,4-Dinitrophenylhydrazin-reaktion. Die in Tab.17. zusammengefassten Ergebnisse veranschaulichen die Wirksamkeit von: a) Äthylacetat

b) Äthylacetat-Äther (1:1 V/V)

c) Äthylacetat-Äther (1:4 V/V)

d) Äthylacetat-Äther (1:9 V/V)

e) Äther

als Extraktionsmittel der Konjugate.

C. Spaltung von Steroidkonjugaten in ätherischer Perchlorsäurelösung.

Für diesen Versuch wurden Harnextrakte hergestellt aus

a) 10 ml Urin,

b) 10 ml Urin + 10,0 µg Dehydroepiandrosteron (als Natrium-dehydroepiandrosteron-sulfat),

c) 10 ml Urin + 10,0 µg Androsteron (als Natrium-androsteron-sulfat),

d) 10 ml Urin + 10,0 µg Androsteron (als Natrium-androsteron-glucuronosid).

Die Proben wurden nach der unter IV.-8.-A. beschriebenen Methode mit Äthylacetat extrahiert, die Äthylacetat-lösungen eingedampft, die Trockenrückstände in 30 ml 0,2-proz. Perchlorsäure in Äther aufgenommen und die Zentrifugengläser mit den Lösungen in ein Wasserbad von 38-40° C gestellt. Sobald der Äther anfing zu sieden, wurden die Röhrchen mit Plastikstopfen fest verschlossen. Man inkubierte die Lösungen 48 Stunden bei 37° C unter gelegentlichem Schütteln. Nach Abkühlen der Proben wurde mit Wasser bis zu neutraler Reaktion, 5 ml 1 N Natronlauge und dreimal mit Wasser gewaschen. Die 2,4-Dinitrophenylhydrazinreaktion mit den Trockenrückständen wurde in üblicher Weise durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tab.11. enthalten.

D. Geschwindigkeit der Solvolyse in Äther-Perchlorsäure.

Zweimal je 4 Proben von 10 ml Sammelurin wurden mit Ammoniumsulfat gesättigt, mit 1 ml 25-proz. Salzsäure angesäuert und dreimal mit je 10 ml Äthylacetat extrahiert. Die entsprechenden Extrakte wurden vereinigt, mit 0,3 ml konz. Ammoniak neutralisiert und bei 40° C im Luftstrom eingedampft. Jeweils 4 Proben versetzte man mit 30 ml 0,2-proz. Perchlorsäure in Äther, bzw. mit 30 ml gesättigter Perchlorsäure in Äther. Die Dauer der Solvolyse bei 37° C betrug 5, 20, 45 und 68 Stunden. Die Farbreaktion und die Auftrennung der 2,4-Dinitrophenylhydrazone erfolgte wie unter IV.-1.-L. angegeben. Die analysierten 17-Ketosteroide sind in Tab.18. aufgeführt. In einer weiteren Versuchsreihe mit gesättigter, ätherischer Perchlorsäure-Lösung wurden die in Abb.14. zusammengestellten Ergebnisse erhalten.

E. Vergleich der 2,4-Dinitrophenylhydrazin-reaktion mit herkömmlichen Methoden.

Sechsmal je 10 ml Sammelurin wurden nach Sättigung mit Ammoniumsulfat und Ansäuern mit 1 ml 25-proz. Salzsäure mittels Äthylacetat extrahiert. Man neutralisierte mit 0,3 ml konz. Ammoniak und dampfte bei 40° C im Luftstrom ein. 3 Proben wurden mit 30 ml 0,01 N Perchlorsäure in Äthylacetat aufgenommen und 3 Stunden bei 50° C bebrütet. Die restlichen 3 unterwarf man einer Äther-Perchlorsäure-solvolyse, wie unter IV.-8.-D. bereits beschrieben. Die Solvolyse dauerte hier 20 Stunden. Nach Waschen der Solvolysate

mit Wasser, 1 N Natronlauge und wiederum Wasser wurden die organischen Extrakte eingedampft und zur Farbreaktion bereitgestellt. Vor der 2,4-Dinitrophenylhydrazin-reaktion erfolgte bei 2 Proben der erstgenannten Serie die Hydrolyse gebildeter Steroid-acetate durch Behandlung mit 1-proz. alkoholischer Kalilauge. Anschließend führte man bei je 2 Proben der beiden Serien die 2,4-Dinitrophenylhydrazin-reaktion durch, während in der dritten die 17-Ketosteroide mittels der Zimmermann-reaktion bestimmt wurden. Bei je einer Probe aus beiden Reihen wurden die 2,4-Dinitrophenylhydrazone der erfassbaren 17-Ketosteroide einzeln, bei der zweiten als Gesamtmenge bestimmt. Zwei zusätzliche Proben des gleichen Sammelurins wurden anstelle von Äthylacetat mit Tetrahydrofuran extrahiert. Die Solvolyse erfolgte hier in 0,01 N Perchlorsäure in Tetrahydrofuran durch 3stündige Bebrütung bei 50° C. Nach entsprechender Reinigung wurde eine Probe der Zimmermann-reaktion, die andere der 2,4-Dinitrophenylhydrazin-reaktion unterworfen und auf die Hauptkomponenten der 17-Ketosteroide untersucht. In Tab.19/a. und 19/b. sind die Messergebnisse zusammengefasst.

V. ZUSAMMENFASSUNG.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Entwicklung einer 2,4-Dinitrophenylhydrazin-reaktion für Ketosteroide zwecks photometrischer Auswertung. In ihrer derzeitigen Form gestattet die vorstehende Reaktion bei ausreichender Spezifität, Richtigkeit und Genauigkeit die Erfassung einer Mindestmenge von 10^{-7} g an Monooxoverbindungen mit einem Molekulargewicht über 280. Die Anwendung eines Spektrodensitometers erhöht die Empfindlichkeit sogar auf $1\text{-}3 \times 10^{-9}$ g. Mit Hilfe dieser empfindlichen Endpunktbestimmung wurden zahlreiche Verfahren für die quantitative Analyse von Steroidhormonen ausgearbeitet, sowie bisherige Methoden überprüft.

Die spektrodensitometrische Auswertung der 2,4-Dinitrophenylhydrazin-reaktion eröffnet zweifellos neue Wege für die Erfassung kleinster Mengen von Ketosteroiden oder von alkoholischen Steroiden, die sich in Ketosteroide überführen lassen.

VI. LITERATURVERZEICHNIS.

1. Zimmermann, W.: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 233, 257 (1935); 245, 47 (1936).
2. Zimmermann, W. und D. Pontius: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 297, 157 (1954).
3. Goldzieher, W. and L.R. Axelrod: J. clin. Endokrinol. Metab., 22, 1234 (1962).
4. Ernest, I., P. Hakkansson, J. Lehmann and B. Sjörgen: Acta endocrinol., 46, 532 (1964).
5. Kellie, A.E. and A.P. Wade: Biochem. J., 66, 196 (1957).
6. James, V.T.: J. Endocrinology 22, 195 (1961).
7. Starnes, W.R., T.F. Partlow, M.C. Grammer, L. Kornel and S.R. Hill: Analyt. Biochem. 6, 82 (1963).
8. Purgotti, A.: G., 24, 255 (1899).
9. Brady, O.L.: Soc., 1931, 756.
10. Campbell, N.R.: Analyst., 61, 391 (1936).
11. Allen, C.F.H., J.H. Richmond: J. org. Chem. 2, 222 (1937).
12. Iddles, H.A., A.W. Low, B.D. Rosen, R.T. Hart: Ind. eng. Chem. Anal., 11, 102 (1939).
13. Curtius, Pflug: J. pr. (2) 44, 543.
14. Fischer, E.: A. 190, 136 (1878).
15. Fischer, E.: B. 16, 661, 2241 (1883).
16. Fischer, E.: B. 30, 1240 (1897).
17. Bromberg, O.: B. 30, 132 (1897).
18. Johnson, G.D.: Am. Soc. 73, 5888 (1951).
19. Allen, C.F.H.: Am. Soc. 52, 2955 (1930).
20. Am.J.Pharm. 105, 381 (1933); vgl. C. 105 I, 1678 (1934).
21. Demaecker, F. e.s. J., R.H. Martin: Natur, 173, 266 (1954).

22. Beereboom, J.J., C. Djerassi: J. Org. Chem., 19, 1196 (1954).

23. Reich, H., K.F. Crane, S.J. Sanfilippo: J. Org. Chem. 18, 822 (1953).

24. Reich, H., B.K. Samuels: J. Org. Chem. 19, 1041 (1954).

25. Gornall, A.G., M.P. Macdonald: J. biol. Chem. 201, 279 (1953).

26. Stupnicki, R., E. Stupnicka: J. Chromatogr. 9, 235 (1962).

27. Stupnicki, R., E. Stupnicka: Nature 200, 165 (1963).

28. Szereday, Z., L. Sachs: Experientia 21, 165 (1965).

29. Starnes, W.R., A.H. Rhodes and R.H. Lindsay: J. clin. Endocr. 26, 1245 (1966).

30. Vestergaard, P.: Acta endocrinol. 8, 193 (1951).

31. Brit. Med. Res. Council: Lancet 1957, 585.

32. Cohen, S.L., I.B. Oneson: J. biol. Chem. 204, 245 (1953).

33. Burstein, S, S. Lieberman: J. biol. Chem. 233, 331 (1959).

34. Burstein, S., G.M. Jacobsohn, S. Lieberman: J. Amer. chem. Soc. 82, 1226 (1960).

35. DePaoli, J.C., E. Nishizawa, K.B. Eik-Nes: J. clin. Endocr. 23, 81 (1963).

36. Lieberman, S., B. Mond, E. Smyles: Recent Progr. Hormone Res. 9, 113 (1954).

37. Treiber, L., G.W. Oertel: Clin. Chim. Acta 17, 81 (1967).

38. Allen, W.M.: J. clin. Endocr. 10, 91 (1950).

39. Oertel, G.W., K.B. Eik-Nes: J. biol. Chem. 232 543 (1958).

40. Fotherby, K. D.N. Love: J. Endocr. 20, 157 (1960).

41. Oertel, G.W., E. Kaiser: Klin. Wschr. 39, 492 (1961).

42. Herman, W., L. Silverman: Proc. Soc. exp. Biol. 94, 426 (1957).

43. Cox, R.I.: J. biol. Chem. 234, 1693 (1959).

44. Morris, R.: Acta endocr. 32, 596 (1959).

45. Treiber, L., G.W. Oertel: Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 5, 83 (1967).

46. Treiber, L., W. Rindt, G.W. Oertel: Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 5, 102 (1967).

47. Venning, E.H., M.M. Hoffmann, J.S.L. Browne: J. biol. Chem. 146, 369 (1942).

48. West, C.D., H. Reich, L.T. Samuels: J. biol. Chem. 193, 219 (1951).

49. Lieberman, S., K. Dobriner: Recent. Progr. Hormone Res. 6, 71 (1948).

50. Kellie, A.E., A.P. Wade: Acta endocr. 23, 357 (1956).

51. Gibian, H., Bratfisch: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 305, 265 (1956).

52. Klatskin, G., O.M. Reinmuth, W. Barnes: J. Lab. Clin. Med. 48, 476 (1956).

53. Grunbaum, B.W., W.J. Fessel, C.F. Piel: Anal. Chem. 33, 860 (1961).

54. P. Sykes: A guidebook to mechanism in organic chemistry, (Verlag Longmans, Green und Co., Ltd., London, 1965), S. 181-182.

VII. TRIVIALNAMEN UND NOMENKLATUR.

Dehydroepiandrosteron	3ß-Hydroxy-androst-5-en-17-on
Androsteron	3α-Hydroxy-5α-androstan-17-on
Ätiocholanolon	3α-Hydroxy-5ß-androstan-17-on
Androstendion	Androst-4-en-3,17-dion
Testosteron	17ß-Hydroxy-androst-4-en-3-on
11ß-Hydroxy-androsteron	3α,11ß-Dihydroxy-5α-androstan-17-on
11ß-Hydroxy-ätiocholanolon	3α,11ß-Dihydroxy-5ß-androstan-17-on
11-Keto-androsteron	3α-Hydroxy-5α-androstan-11,17-dion
11-Keto-ätiocholanolon	3α-Hydroxy-5ß-androstan-11,17-dion
Androstandion	5α-Androstan-3,17-dion
Ätiocholandion	5ß-Androstan-3,17-dion
11-Keto-androstendion (Andrenosteron)	Androst-4-en-3,11,17-trion
11ß-Hydroxy-androstendion	11ß-Hydroxy-androst-4-en-3,17-dion
Ätiocholantrion	5ß-Androstan-3,11,17-trion
16-Keto-androstendiol	3ß,17ß-Dihydroxy-androst-5-en-16-on
Pregnenolon	3ß-Hydroxy-pregn-5-en-20-on
Progesteron	Pregn-4-en-3,20-dion
17-Hydroxy-pregnenolon	3ß,17α-Dihydroxy-pregn-5-en-20-on
17-Hydroxy-progesteron	17α-Hydroxy-pregn-4-en-3,20-dion
Corticosteron	11ß,21-Dihydroxy-pregn-4-en-3,20-dion
Cortisol	11ß,17α,21-Trihydroxy-pregn-4-en-3,20-dion

Cortison	17α,21-Dihydroxy-pregn-4-en-3,11,20-trion
Desoxycorticosteron	21-Hydroxy-pregn-4-en-3,20-dion
Pregnendiolon	3ß,21-Dihydroxy-pregn-5-en-20-on
Dihydrocortisol	11ß,17α,21-Trihydroxy-pregnan-3,20-dion
Tetrahydrocortisol	3α,11ß,17α,21-Tetrahydroxy-5ß-pregnan-20-on
Androstandiol	5α-Androstan-3α,17ß-diol
Ätiocholandiol	5ß-Androstan-3α,17ß-diol
Pregnandiol	5ß-Pregnan-3α,20α-diol
Pregnantriol	5ß-Pregnan-3α,17α,20α-triol

VIII. HERKUNFT DER PRÄPARATE UND HILFSMITTEL.

Sämtliche Steroide und Steroid-konjugate wurden von der Firma Mann Research Laboratories, Inc., New York 6. N.Y. bezogen.

Die radioaktiv-markierten Verbindungen lieferte die Firma New England Nuclear Corp., 575 Albany Street, Boston, Massachusetts 02 118.

Alle übrigen Chemikalien, Hilfsmittel, Lösungsmittel und Adsorbentien wurden von der Firma E. Merck AG., Darmstadt bezogen.

Herrn Prof. Dr. G.W. Oertel, Leiter der Abteilung für Experimentelle Endokrinologie der Universitäts-Frauenklinik Mainz (Direktor: Prof. Dr. V. Friedberg) gilt mein ganz besonderer Dank sowohl für die Überlassung des Themas als auch für die ständige Hilfsbereitschaft und die großzügige Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. B. Eistert, Direktor des Instituts für Organische Chemie der Universität des Saarlandes, für seine Hinweise und die von ihm erfahrene Hilfe.

Herrn Dr. med. P. Knapstein, Hosp. Univers. Pa. Philadelphia (U.S.A.), sowie der Dr. Bruno Lange GmbH (Berlin) danke ich für die zahlreichen densitometrischen Messungen.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. V. Bruckner, Direktor des Instituts für Organische Chemie der Loránd-Eötvös-Universität Budapest (Ungarn), der mich in die Methoden der modernen organischen Chemie einführte und der somit die Voraussetzungen zum Gelingen dieser Arbeit legte, danke ich auf diesem Wege vielmals.

LEBENSLAUF.

Ich, László Richard Treiber, wurde am 25.12.1937 in Tiszaroff (Kreis Szolnok, Ungarn) als Sohn des österreichischen Staatsangehörigen Richard Josef Treiber und seiner Ehefrau Maria, geb. Németh geboren.

Von 1944-1952 besuchte ich die Volksschule in Rákoshegy (Stadteil von Budapest), Abádszalók (Kreis Szolnok) und Budapest und von 1952-1956 das Gymnasium in Budapest, wo ich das Abitur 1956 bestand. Noch im gleichen Jahr immatrikulierte ich an der Loránd-Eötvös-Universität der Naturwissenschaften in Budapest.

Nach fünfjährigem Studium fertigte ich meine Diplomarbeit "Untersuchungen aus dem Kreis der Isocytosine" im Institut für Organische Chemie bei Herrn Prof. Dr. Victor Bruckner an. Die Diplomhauptprüfung legte ich im Juni 1961 mit der Note "gut" ab.

Vom August 1961- April 1963 war ich bei der Firma "Nitrokémia Ipartelepek" (Nitrochemische Industrieanlagen") als Betriebsingenieur, ab April 1963 als Forschungsingenieur (Organiker) in dem Entwicklungslaboratorium der gleichen Firma beschäftigt. Im März 1964 wurde ich zum Leiter der organischen-chemischen Forschungsabteilung des Entwicklungslaboratoriums ernannt.

Aus politischen Gründen verließ ich Ungarn im Juni 1965 und kam nach West-Deutschland.

Hier trat ich im September 1965 in die Abteilung für Experimentelle Endokrinologie, Institut für Hygiene und

Mikrobiologie der Universität des Saarlandes in Homburg/ Saar (Vorsteher Prof. Dr. G.W. Oertel) ein, wo ich bis zum 31. Oktober 1966 als Stipendiant der Deutschen Forschungsgemeinschaft beschäftigt war. Seit November 1966 bin ich Assistent der Abteilung für Experimentelle Endokrinologie, Universität Mainz.

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit vom September 1965 bis Oktober 1966 an der Universität des Saarlandes, vom November 1966 bis April 1968 an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz in der Abteilung für Experimentelle Endokrinologie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. G.W. Oertel.